

ANTÔNIO BALDIN JÚNIOR

**ESTUDO CLÍNICO-PATOLÓGICO E DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA
P53 NAS DISPLASIAS ASSOCIADAS À RETOCOLITE ULCERATIVA**

**Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre. Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia
e Patologia da Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz
Telles**

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Araújo Bonardi

Coordenadora: Prof^a Dr^a Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA

2005

Baldin Júnior, Antônio

Estudo clínico-patológico e da expressão da proteína p53
nas displasias associadas à retocolite ulcerativa/ Antônio
Baldin Júnior. – Curitiba, 2005.
xi, 49 f.

Orientador: Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles.
Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná.

1.Proctocolite. 2.Genes p53. 3.Retocolite ulcerativa.
3.Patologia. I.Título.

NLM- WI 529

TERMO DE APROVAÇÃO

ANTÔNIO BALDIN JÚNIOR

ESTUDO CLÍNICO-PATOLÓGICO E DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P53 NAS DISPLASIAS ASSOCIADAS À RETOCOLITE ULCERATIVA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles
Setor de Ciências da Saúde, UFPR

Prof.. Dr. Sérgio Brenner

Prof. Dr. Kiyoshi Iriya

Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Sartor

Curitiba, 14 de Abril de 2005.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. JOSÉ EDERALDO QUEIROZ TELLES,
por seu apoio e orientação.

Ao Prof. Dr. RENATO ARAÚJO BONARDI,
por seu apoio e orientação.

À Prof.^a Dr.^a HEDA MARIA BARSKA DOS SANTOS AMARANTE,
pelos ensinamentos e orientação.

À Prof.^a Dr.^a MARIA CRISTINA SARTOR,
pelo apoio e estímulo.

À Prof.^a Dr.^a GISELI KLASSEN,
pelo apoio e orientação.

À Prof.^a Dr.^a VANETE THOMAZ SOCCOL, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

À Prof.^a Dr.^a TERESA MARIA DA SILVA FIGUEIREDO,
por sua colaboração e apoio.

Aos PROFESSORES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA, nível mestrado, da Universidade Federal do Paraná, pelos ensinamentos e colaboração.

Aos PROFESSORES E MÉDICOS DO SERVIÇO DE ENDOSCOPIA DIGESTIVA do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração.

Aos PROFESSORES E MÉDICOS DO SERVIÇO DE CIRURGIA GERAL do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração.

Aos PROFESSORES E MÉDICOS DO SERVIÇO DE ANATOMIA PATOLÓGICA do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração.

Aos MÉDICOS RESIDENTES DO SERVIÇO DE ENDOSCOPIA DIGESTIVA do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio.

A JULIANA GONÇALVES ROCHA, VINICIUS JOSÉ COTA SCHIOCHET, GUILHERME MATIOLI NICOLLELLI e MARCOS DE ABREU BONARDI, médicos residentes e ex- residente do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio.

A LUIZ KOTZE, médico residente do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio.

Aos FUNCIONÁRIOS DO SERVIÇO DE ANATOMIA PATOLÓGICA do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração.

A LUCIANA AKEMI TAKAHASHI, acadêmica do curso de Medicina, por seu empenho e valorosa colaboração.

À Prof.^a MÁRCIA OLANDOSKI e ao Prof. ARI ELIAS SABBAG JÚNIOR, pela análise estatística.

Dedico este trabalho aos meus pais Antônio e Dirce,
à minha esposa Rosimeri e aos meus filhos Rafael e
Bruno.

“O homem que quiser contemplar a verdade deve manter a calma dentro de si mesmo. O seu espírito deve ser como a água serena de um lago”. (Alexis Carrel, em “O Homem esse Desconhecido”)

SUMÁRIO

LISTA DE QUADRO E TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS	viii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO INTESTINO NORMAL	3
2.1.1 Revestimento Epitelial	3
2.1.2 Lâmina Própria	4
2.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL	5
2.2.1 Definições	5
2.2.2 Epidemiologia	6
2.2.3 Patogênese	6
2.2.4 Aspectos Clínicos	8
2.2.5 Aspectos Macroscópicos	9
2.2.6 Aspectos Histopatológicos	10
2.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS E ASPECTOS MACRO E MICROSCÓPICOS DAS DISPLASIAS NA RETOCOLITE ULCERATIVA	11
2.3.1 Displasia - Definições	11
2.3.2 Displasia – Histórico	12
2.3.3 Displasia – Classificação da Mucosa Cólica quanto à Presença de Displasia	13
2.3.3.1 Mucosa negativa para displasia	14
2.3.3.1.1 Mucosa normal	14
2.3.3.1.2 Colite quiescente	14
2.3.3.1.3 Colite ativa	14
2.3.3.2 Mucosa indefinida para displasia	15
2.3.3.2.1 Provavelmente negativa	15
2.3.3.2.2 Desconhecida	15
2.3.3.2.3 Provavelmente positiva	16
2.3.3.3 Mucosa positiva para displasia	16
2.3.3.3.1 Displasia de baixo grau	16
2.3.3.3.2 Displasia de alto grau	17
2.3.4 Displasia – Modificação da Classificação de Mucosa Cólica quanto à Presença de Displasia	17

2.3.5 Displasia – Displasia Associada com Lesão ou Massa (DALM)	17
2.3.6 Displasia – Concordância Diagnóstica	18
2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GENE P53 SUPRESSOR DE TUMOR	18
2.4.1 Mecanismos pelos quais o <i>p53</i> Induz a Suspensão do Ciclo Celular e a Apoptose	19
2.4.2 Atuação do <i>p53</i> no Câncer Colorretal	19
2.4.3 Uso Clínico da Identificação do <i>p53</i> Mutante	21
3 MATERIAL E MÉTODO	25
3.1 CASUÍSTICA	25
3.2 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	25
3.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS DISPLASIAS	26
3.4 PROCESSAMENTO IMUNOISTOQUÍMICO	27
3.5 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA	28
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4 RESULTADOS	30
4.1 DISPLASIAS E DADOS CLÍNICOS	30
4.2 DISPLASIAS E IMUNOISTOQUÍMICA <i>P53</i>	31
4.3 DISPLASIA E COR DO PACIENTE	31
4.4 DISPLASIA E SEXO DO PACIENTE	32
4.5 DISPLASIA E EXTENSÃO DA DOENÇA	32
4.6 DISPLASIA E IDADE DO PACIENTE NO INÍCIO DA DOENÇA (<15 ANOS OU ≥15 ANOS)	33
4.7 DISPLASIA E IDADE DO PACIENTE NA ÚLTIMA BIÓPSIA (<40 ANOS OU ≥40 ANOS) . .	33
4.8 TEMPO DE DOENÇA NOS GRUPOS COM E SEM DISPLASIA	34
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICES	
1 CRITÉRIOS HISTOPATOLÓGICOS PARA DIFERENCIAÇÃO ENTRE DISPLASIA E REPARO	48
2 EXAMES COM DISPLASIA E RESULTADOS DA <i>P53</i>	49

LISTA DE QUADRO E TABELAS

QUADRO 1	CLASSIFICAÇÃO DA MÚLCOSA CÓLICA QUANTO À DISPLASIA EM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL	13
TABELA 1	VARIÁVEIS – DADOS CLÍNICOS	30
TABELA 2	DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS DOS TEMPOS DE DOENÇA NA ÚLTIMA BIÓPSIA	35
TABELA 3	TEMPO DE EVOLUÇÃO	35

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

FIGURA 1	ÁREA DE DISPLASIA	26
FIGURA 2	DISPLASIA <i>P53</i> POSITIVA	28
FIGURA 3	DISPLASIA <i>P53</i> POSITIVA – CONTAGEM CELULAR	29
GRÁFICO 1	TEMPO LIVRE DE DISPLASIA E COR	31
GRÁFICO 2	TEMPO LIVRE DE DISPLASIA E SEXO	32
GRÁFICO 3	TEMPO LIVRE DE DISPLASIA E EXTENSÃO	33
GRÁFICO 4	TEMPO LIVRE DE DISPLASIA E IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA	34
GRÁFICO 5	TEMPO LIVRE DE DISPLASIA E IDADE	34
GRÁFICO 6	TEMPO DE DOENÇA E DISPLASIA	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	atipia regenerativa
BANPESQ	Sistema de banco de pesquisas
CD4	Conjuntos de diferenciação de número 4
CD8	Conjuntos de diferenciação de número 8
DAG	Displasia de alto grau
DALM	Displasia associada com lesão ou massa
DBG	Displasia de baixo grau
ID	Indefinido para displasia
DII	Doença inflamatória intestinal
HE	Hematoxilina-eosina
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina do isótipo A
IgE	Imunoglobulina do isótipo E
IgG	Imunoglobulina do isótipo G
IgM	Imunoglobulina do isótipo M
IL 2	interleucina de número 2
IL 4	Interleucina de número 4
IL 5	Interleucina de número 5
IL 6	Interleucina de número 6
IL 10	Interleucina de número 10
IMS	Instabilidade de microssatélites
P21	Proteína p21
P53	Proteína p53
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
RU	Retocolite ulcerativa
T	Linfócitos do tipo T
Th 1	Linfócito do tipo T CD4 inflamatório
Th 2	Linfócito do tipo T CD4 auxiliar

RESUMO

A associação entre retocolite ulcerativa e adenocarcinoma cólico está amplamente relatada na literatura sendo desenvolvidas estratégias para seguimento dos pacientes e detecção precoce das lesões displásicas e neoplásicas. Foram estudados os exames anatomopatológicos e dados clínicos de 124 portadores de retocolite ulcerativa cadastrados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, com o objetivo de analisar a ocorrência de displasia entre eles, comparar os dados clínicos daqueles com e sem displasia e verificar a superexpressão imunoistoquímica da proteína *p53* nas displasias. A ocorrência de displasia foi baixa (9,67%) e de baixo grau em todos os casos. Na comparação dos dados clínicos dos pacientes com e sem displasia não houve diferença estatisticamente significativa com relação à cor, idade no início da doença, idade na última biópsia, extensão da doença e tempo de evolução da doença. Houve diferença estatística para displasia, com predomínio de pacientes do sexo masculino (58,34%). Dos 12 pacientes com displasia, a proteína *p53* foi positiva em 5 (41,66%). Conclui-se que a ocorrência de displasia foi baixa e maior no sexo masculino.

ABSTRACT

The association between ulcerative colitis and colorectal adenocarcinoma is widely related in the literature. Surveillance strategies of patients and early detection of the neoplastic change were established. In order to get more insights about this topic, were analysed biopsy samples and clinical data of 124 patients with ulcerative colitis at Hospital de Clinicas, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil. The aim of this study was to assess dysplasia in patients with ulcerative colitis, evaluate demographic data with and without dysplasia and to verify the *p53* over expression immunohistochemical reaction in dysplasia. Dysplasia event was low (9.67%) and all cases with low-grade dysplasia. Patients clinical data comparison with and without dysplasia did not show significant statistical differences with regard to the color, age at the start of the disease, age at last biopsy, duration and anatomic extent of ulcerative colitis. Significant difference was found between males and females with predominance of males (58.34%) for dysplasia. Twelve patients with dysplasia, 5 patients (41.66%) were *p53* positive. It concludes that dysplasia event was low. Dysplasia incidence was larger in males.

1 INTRODUÇÃO

A retocolite ulcerativa (RU) enquadra-se no grupo das doenças inflamatórias intestinais crônicas de causa desconhecida. Com surtos de remissão e exacerbação, apresenta incidência mundial de 3-20 novos casos por ano para cada 100 000 habitantes (FREITAS; TACLA, 2001). Sua principal característica é a inflamação da mucosa intestinal. Essa inflamação resulta na perturbação da função de barreira mucosa, o que promove ainda mais a exposição do sistema imunológico mucoso aos produtos bacterianos luminais (ABREU, 2003).

RU com mais de 8 anos de evolução representa importante fator de risco para o aparecimento de displasia e subsequente desenvolvimento de adenocarcinoma (BERNSTEIN et al., 1994; LENNARD-JONES; MELVILLE; MORSON, 1990). A reposição (*turnover*) aumentada das células epiteliais intestinais lesadas pela inflamação crônica é considerada fator de risco para o aparecimento de displasia e adenocarcinoma em indivíduos com longo tempo de evolução da RU (ARAI et al., 1999). O risco de desenvolver câncer colorretal varia de 5,5% a 13,5% entre os portadores de RU, e os fatores de risco incluem a extensão da doença e o tempo de evolução (POHL et al., 2000). A displasia é utilizada como marcador na RU, pois o achado de displasia de baixo grau está associado com 10% de probabilidade de carcinoma invasivo, e o de displasia de alto grau com 40% (GUINDI; RIDDELL, 2001).

A vigilância e o seguimento dos pacientes são feitos por meio de colonoscopias e biópsias seriadas – estas cobrem menos de 0,05% da superfície cólica (RUBIN et al., 1992). Alterações genéticas têm sido estudadas nos portadores de RU, para caracterizar lesões displásicas e para detectar precocemente a carcinogênese (POHL et al., 2000).

De todos os marcadores estudados, a expressão da proteína *p53* tem demonstrado correlação significativa com o tempo de doença, como fator do risco para desenvolver câncer colorretal associado com RU (ITZKOWITZ, 2003).

O gene supressor de tumor *p53* é freqüentemente inativado por mutação ponto e perda da heterozigose. Isto resulta na ausência de produção ou na produção excessiva de uma proteína inativa, levando a superexpressão nuclear. Também a amplificação do gene MDM-2 e a expressão de proteínas oncovirais podem inativar a proteína *p53* (VOGELSTEIN et al., 2000). Embora a superexpressão da proteína

p53 seja um evento tardio na carcinogênese colorretal, ela é considerada um evento precoce no aparecimento da displasia associada com a RU (URBANSKI et al., 2000). O aparecimento da superexpressão do *p53*, por meio de proteína anômala, no núcleo das células epiteliais da mucosa intestinal dos portadores de RU ocorre mesmo sem a presença da displasia e precede ao desenvolvimento da displasia e do câncer colorretal (LASHNER et al., 1999).

A superexpressão da proteína *p53*, a aneuploidia do DNA e o perfil de mucinas têm-se correlacionado cronologicamente com o risco de desenvolver câncer colorretal associado com RU (ITZKOWITZ, 2003).

1.1 OBJETIVOS

1. Verificar a ocorrência de displasia nos pacientes com retocolite ulcerativa.
2. Comparar dados clínicos dos pacientes com e sem displasia.
3. Verificar a superexpressão imunoistoquímica da proteína *p53* na displasia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO INTESTINO NORMAL

2.1.1 *Revestimento epitelial*

O epitélio superficial da mucosa cólica é colunar simples ou cuboidal, composto por células absortivas e caliciformes. Ambas são polarizadas e se aderem ao complexo da membrana basal. As células absortivas, que são responsáveis pelo transporte de íons e água, apresentam luminalmente borda estriada apical chamada *cutícula*. O citoplasma dessas células é eosinofílico e não contém mucina. Seus núcleos são ovais, uniformes, basalmente orientados, com seu eixo paralelo ao eixo longo das células e nucléolo visível.

As células caliciformes sintetizam, armazenam e secretam glicoproteínas. Seu citoplasma parece vazio nos cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE). Contudo em colorações especiais para mucina observa-se grande quantidade de material em seu interior. Os núcleos dessas células, orientados basalmente, indentados ou deformados pelos grânulos de muco, coram-se mais intensamente pela hematoxilina, o que torna o nucléolo inaparente. Linfócitos e ocasionais eosinófilos podem estar presentes no epitélio superficial, bem como ocasionais vacúolos apoptóticos contendo restos celulares. Podem ser observados até 15 linfócitos para cada 100 células epiteliais (TANAKA et al. 1999).

Um fino complexo de membrana basal, composto por colágeno e outras proteínas, ancora as células epiteliais. É uma estrutura permeável à absorção ou excreção de íons, água e proteínas, bem como à passagem de leucócitos da lâmina própria para a camada epitelial. A espessura desse colágeno subepitelial varia de 3 a 6,6 μm (TALBOT; PRICE, 1987).

O epitélio cóptico, simples e colunar, compreende uma população mais heterogênea de células do que a existente no epitélio superficial. Além das células absortivas maduras e células caliciformes, há também células precursoras, imaturas e indiferenciadas, além de células endócrinas especializadas e células de Paneth nas criptas. As células endócrinas comumente apresentam polaridade oposta à da maioria das células absortivas e caliciformes, com grânulos citoplasmáticos localizados abaixo do núcleo. As células de Paneth, cuja função é desconhecida,

são secretoras, têm formato piramidal e mantêm a polaridade basal dos núcleos. Seus grânulos, eosinofílicos na coloração com HE e apicais ao núcleo, estão presentes normalmente apenas no ceco e no cólon direito; sua presença em outras regiões cólicas indica metaplasia, geralmente resultante de inflamação crônica (LEVINE; HAGGITT, 1989).

A renovação do epitélio cólico – que leva de 3 a 8 dias – resulta de importante função das células das criptas cólicas, que, devido a seu curto tempo de vida, são constantemente esfoliadas para a luz intestinal. A zona de proliferação na base das criptas é definida pela atividade proliferativa das células epiteliais precursoras que mantêm a capacidade de dividir-se. Essas células estão confinadas na metade basal das criptas, mas ocasionalmente podem ser encontradas próximo à superfície. A zona de maturação encontra-se nos 25% da cripta na porção superficial. Nessa zona a maioria das células perdem a capacidade de proliferação, mas continuam sua maturação até serem esfoliadas na superfície (LEVINE; HAGGITT, 1989).

2.1.2 Lâmina própria

A lâmina própria forma o estroma da mucosa e estende-se do complexo da membrana basal até a camada muscular da mucosa. Contém vários tipos de células, predominantemente no terço superficial, entremeadas por feixes colágenos frouxamente organizados. A maioria dessas células – entre as quais predominam os plasmócitos – são responsáveis pela defesa local contra os agentes nocivos do conteúdo intestinal. Produzem imunoglobulinas, principalmente IgA, e também sintetizam IgM, IgG e IgE. IgA e IgM podem transpor o epitélio intestinal atingindo a luz do cólon.

Linfócitos T estão presentes na lâmina própria, no epitélio superficial e na submucosa. Os linfócitos intra-epiteliais podem ser diferenciados dos núcleos das células absortivas e das células caliciformes por seu menor tamanho, cromatina densa e homogênea e estreita rima de citoplasma perinuclear. Os linfócitos da lâmina própria estão distribuídos difusamente ou organizados em folículos confinados nela e/ou na submucosa. Quando isso ocorre há descontinuidade da camada muscular da mucosa, formando os complexos linfoglandulares. O epitélio

sobre os folículos difere no aspecto de suas células, que passam a ser cubóides, e no aumento da quantidade de linfócitos intra-epiteliais (LEVINE; HAGGITT, 1989).

As células mielóides, que normalmente residem na lâmina própria, incluem os eosinófilos e mastócitos. Os eosinófilos são bem menos numerosos do que os linfócitos, e os mastócitos mais raros. Os neutrófilos não são encontrados no epitélio superficial e críptico normal e são raros na lâmina própria. Os fibroblastos estão distribuídos na lâmina própria – ou ao redor das criptas ou junto ao complexo da membrana basal subepitelial –, onde produzem colágeno. Os macrófagos são importantes no processamento e na apresentação de material antigênico para outras células imunológicas; pigmentos podem ser encontrados no seu interior, relacionados à fagocitose de substâncias como hemossiderina, metabólitos de medicamentos laxantes ou muco das células caliciformes. Em pequena quantidade podem ser encontrados na mucosa normal, porém em número aumentado podem ser indicativos de doença metabólica de acúmulo ou de infecção (LEVINE; HAGGITT, 1989).

Na lâmina própria há apenas capilares sangüíneos com paredes finas, em cuja luz existem eritrócitos e neutrófilos. Os vasos linfáticos estão limitados à região da base das criptas, logo acima da camada muscular da mucosa – fina camada muscular que separa a mucosa da submucosa. Alguns miócitos estendem-se para cima dessa camada, na lâmina própria. A muscular da mucosa é normalmente atravessada por complexos linfoglandulares, vasos e nervos (LEVINE; HAGGITT, 1989).

2.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

2.2.1 Definições

Neste trabalho optou-se pelo uso de denominações específicas das doenças analisadas, como definidas abaixo:

DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL: Representa um grupo de doenças inflamatórias em que a interação de fatores genéticos, ambientais e microbiológicos possivelmente leva à ativação do sistema imune e não imune do intestino com a produção de múltiplas substâncias (anticorpos, citocinas, fatores de crescimento,

neuropeptídios, enzimas proteolíticas e eicosanóides, metabólitos reativos do oxigênio e nitrogênio) que iniciariam e manteriam a lesão inflamatória tecidual (FIOCCHI, 1998).

RETICULITE ULCERATIVA: Doença inflamatória de etiologia desconhecida, provavelmente multifatorial, que acomete preferencialmente a mucosa do reto e do cólon esquerdo, mas eventualmente todo o cólon. Trata-se de doença crônica com surtos de remissão e exacerbação, caracterizada por diarreia e perda de sangue por via retal. Além das manifestações intestinais, pode ser acompanhada de manifestações sistêmicas (FREITAS; TACLA, 2001).

2.2.2 Epidemiologia

A prevalência e a incidência da DII variam amplamente e dependem de múltiplos fatores, incluindo etnia e localização geográfica. Segundo KANDICE (2002), a prevalência da DII nos Estados Unidos da América é de aproximadamente 100 casos por 100 000 habitantes, com 10 000 casos novos diagnosticados anualmente. A de RU é de 70 a 150 por 100 000 (GLICKMAN, 1998).

No estudo europeu a média de incidência da de vários centros é de 10 casos de RU por 100 000 habitantes. A prevalência nesse estudo foi de 303 casos de RU por 100 000 habitantes (BINDER, 2004).

RU parece incidir igualmente em homens e mulheres, com distribuição bimodal típica: entre 15-35 anos e 60-70 anos de idade para homens. Nas mulheres a faixa mais acometida é dos 15 aos 35 anos. A incidência mundial é de 3-20 casos por 100 000 (FREITAS; TACLA, 2001).

2.2.3 Patogênese

A etiologia exata da DII é desconhecida, mas há várias propostas de explicação focando a atenção em três teorias primárias: 1. suscetibilidade genética; 2. agentes infecciosos aliados a desencadeantes ambientais e 3. distúrbios da regulação imune (SARTOR, 1997). Segundo KANDICE (2002), todas as teorias estão implicadas e nenhum fator isolado é causal.

1. Na RU há concordância entre gêmeos monozigóticos, incidência familiar aumentada, com prevalência 30 vezes maior entre irmãos de doentes do que na população em geral (FREITAS; TACLA, 2001).

2. Microorganismos têm sido pesquisados, incluindo vírus, fungos, clamídias, bactérias atípicas e micobactérias (CHIODINI et al., 1989). Por outro lado, muitas doenças infecciosas podem ser confundidas com DII. Esses agentes incluem numerosos patógenos, como paramixovírus, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, entre outros. Adicionalmente fatores desencadeantes, como estresse, tabagismo, dieta e uso de antiinflamatórios não esteróides, têm sido implicados. Esses agentes infecciosos ou ambientais cruzam a barreira intestinal e desencadeiam uma seqüência de eventos que resultam em inflamação (KANDICE, 2002).

3. A idéia de participação de mecanismos imunes é baseada nas manifestações sistêmicas que podem acompanhar essas doenças e na resposta terapêutica a agentes imunossupressores. Estudos sugerem que a DII pode resultar de distúrbio da regulação imune em resposta a antígenos comumente presentes na luz intestinal. Em pessoa normal parece haver um balanço entre os mediadores da inflamação (citocinas pró- e antiinflamatórias). Na DII, a tolerância imunológica à flora endógena pode ser aberrante e resultar em desequilíbrio entre citocinas pró- e antiinflamatórias. Conseqüentemente uma resposta imune inapropriada pode ocorrer e estimular inflamação crônica (KANDICE, 2002). Trabalhos tentando evidenciar anticorpos humorais e imunidade celular não têm conseguido revelar alterações imunes específicas para RU (MacDERMOTT et al., 1988).

De acordo com FREITAS e TACLA (2001), sob condições fisiológicas, os enterócitos ativam seletivamente células T CD8+ supressoras não-específicas na resposta à inflamação. Os enterócitos, nos pacientes com DII, estimulam seletivamente o desenvolvimento de células T auxiliaadoras CD4+. Há dois tipos básicos de resposta: Th1, que ativa interleucina IL-2 e interferon gama (IFN-gamma) e resulta em hipersensibilidade tardia e imunidade celular; e Th2, que ativa IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 e resulta em resposta por anticorpos e imunidade humoral. Normalmente há reciprocidade entre as duas: se a Th1 é estimulada, a Th2 é inibida. Na DII, todavia, a inibição recíproca está diminuída e o tipo de resposta imune também está sob regulação genética: na RU há resposta Th2 exagerada.

Além desses fatores, aspectos psicológicos associando, em alguns casos, crises emocionais com início de surtos das doenças têm demonstrado a co-participação de tais eventos em pacientes com DII (GLICKMAN, 1998).

2.2.4 Aspectos Clínicos

RU é caracterizada por inflamação crônica superficial apenas do cólon, não comprometendo o intestino delgado. Tipicamente as lesões começam no reto e se estendem proximalmente em um padrão contínuo e confluyente. Os locais mais comumente afetados são o reto e o cólon sigmóide em 30% dos casos; o reto, o cólon sigmóide e o cólon descendente, em 40%; e todo o cólon, em 30% (STENSON, 1995).

O grau de atividade inflamatória é altamente variável, desde leve, com longos períodos de remissão, até severo. O sangramento retal é o sintoma de apresentação mais comum; outros sintomas incluem a passagem de descargas mucopurulentas pelo reto, urgência fecal, tenesmo e cólicas abdominais (ROSE, 1998).

A associação entre RU e câncer colorretal tem sido confirmada em vários estudos, segundo os quais o risco de câncer é variável e dependente de fatores como tempo de evolução da RU e extensão da doença. As chances de ocorrer câncer na retocolite ulcerativa são maiores nos pacientes com mais de dez anos de doença e nos casos de pancolites. Em crianças acometidas da doença é incomum o câncer. O risco de câncer colorretal em pacientes com RU tem diminuído em pacientes tratados com drogas antiinflamatórias (TSIANOS, 2000).

GORFINE et al. (2000) revisaram os espécimes cirúrgicos de 590 portadores de RU submetidos à proctocolectomia ou proctocolectomia restauradora entre 1987 e 1999. O acompanhamento dos pacientes foi realizado com colonoscopias anuais e biópsias seriadas da mucosa cólica, para detecção de câncer ou displasia. Analisados os laudos de biópsias de colonoscopias realizadas em 160 pacientes, verificou-se que 77 espécimes cirúrgicos continham pelo menos um foco de displasia. Câncer invasivo foi significativamente mais comum em pacientes com displasia (33/77 contra 5/513, $p < 0,001$). O diagnóstico de displasia esteve associado com risco maior de aparecimento de câncer. O valor preditivo positivo de um achado pré-operatório de displasia de qualquer grau foi de 50% para câncer. Os autores

concluem que, até o aparecimento de um marcador melhor, o achado de displasia deve ser visto com forte suspeita de coexistência com câncer colorretal.

EKBOM et al. (1990), analisando o risco de câncer colorretal em 3 117 portadores de RU que tiveram o diagnóstico entre 1922 e 1983, verificaram que 91 tiveram câncer colorretal. A idade de diagnóstico e a extensão da doença foram fatores de risco independentes para o câncer colorretal. Para os pacientes com extensão da colite comprometendo apenas o lado esquerdo do cólon o índice de incidência de câncer foi de 2,8%, e para aqueles com pancolite foi de 14,8%. O risco absoluto de câncer colorretal em pacientes com 35 anos de evolução da doença foi de 30% em pacientes com pancolite e de 40% quando o diagnóstico foi feito antes dos 15 anos de idade.

RIEGLER et al. (2003) estudaram retrospectivamente portadores de RU que apresentaram displasia de alto grau ou carcinoma colorretal. O estudo teve a participação de 28 centros italianos especializados em manejo de doença inflamatória intestinal. Num total de 112 pacientes foi encontrada média de 13,9 anos de evolução da doença, com mediana de 12 anos. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre pancolite e colite esquerda para o câncer. Entre 14 pacientes que tinham coto retal devido a colectomia com anastomose ileorretal, 13 tinham câncer e 1 tinha displasia de alto grau.

2.2.5 Aspectos Macroscópicos

Na RU em fase ativa encontra-se a mucosa cólica com ulcerações, hiperemia e hemorragia. Esses aspectos são caracteristicamente uniformes e contínuos, sem áreas de mucosa normal de permeio. O reto é afetado em cerca de 95% dos casos e a inflamação se estende proximalmente de forma contínua, por extensão variável. Quando todo o cólon é atingido pode haver comprometimento de poucos centímetros do íleo terminal, denominado *ileíte de refluxo*, o que, entretanto, não acarreta espessamento ou estenose. O megacólon tóxico é apresentação severa e aguda da RU, na qual a parede intestinal pode tornar-se extremamente fina e desnuda da camada mucosa, com inflamação se estendendo até a camada serosa, levando a dilatação do cólon e subsequente perfuração (GLICKMAN, 1998).

Com agudização recorrente da inflamação podem surgir características macroscópicas de cronicidade. Fibrose e retração longitudinal resultam em

encurtamento do cólon, e as saculações são perdidas, retificando seus contornos. Focos de mucosa regenerativa e inflamada circundados por áreas ulceradas, apresentando aspecto polipóide e fazendo protrusão para a luz intestinal são denominados *pseudopólipos inflamatórios* (GLICKMAN, 1998).

2.2.6 Aspectos Histopatológicos

Na RU há inflamação das camadas mucosa e submucosa com exuberante exsudato neutrofílico, dano epitelial e perda das células superficiais. Resultam múltiplas ulcerações, deixando exposta às vezes a camada muscular. As criptas são destruídas pelos abscessos que nelas se formam com o exsudato neutrofílico. Esse exsudato, além de edema, provoca também a perda do epitélio críptico e de células mucossecretoras (LIU; CRAWFORD, 2005).

Ciclos repetitivos de inflamação e remissão podem levar a discreta fibrose da submucosa e desorganização mucosa. Alterações regenerativas são evidenciadas por criptas com arquitetura irregular por vezes bifurcada na sua base. A atipia nuclear e a perda da diferenciação citoplasmática podem existir na mucosa cólica não inflamada e na inflamada. (LIU; CRAWFORD, 2005).

MORSON et al. (1990) descrevem as alterações microscópicas das biópsias retais da RU nas fases de colite ativa, resolução e quiescente. As seguintes alterações são observadas:

FASE ATIVA: A RU é primariamente uma doença inflamatória da mucosa; não se estende além da submucosa, exceto na colite fulminante. A superfície da mucosa é irregular, com pus luminal; apresenta perda do epitélio, com ulcerações e intensa congestão vascular; aumento das células inflamatórias na lâmina própria; infiltrado polimorfonuclear com abscessos crípticos e edema; depleção de mucina das células caliciformes.

FASE DE RESOLUÇÃO: A resolução pode ocorrer em diferentes graus e em diferentes locais anatômicos, dando falsa impressão de doença segmentar, não só macroscópica mas também microscopicamente. Nessa fase há redução da congestão vascular, com gradual desaparecimento das células polimorfonucleares e dos abscessos crípticos. A população de células caliciformes é restaurada. O epitélio

encontra-se em fase de hiperplasia reacional e de restauração da continuidade. Ocorre declínio da população de linfócitos e de células plasmáticas.

FASE DE REMISSÃO: Variados graus de atrofia críptica marcam essa fase. Ocorre perda do paralelismo, com separação e ramificação das criptas, espessamento da muscular da mucosa e metaplasia de células de Paneth.

2.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS E ASPECTOS MICROSCÓPICOS DAS DISPLASIAS NA RETOCOLITE ULCERATIVA

2.3.1 Displasia – Definições

Displasia (do grego *dis* = dificuldade e *plasein* = formar) – termo bastante abrangente – é toda organização anormal ou diferenciação desordenada de células ou de tecidos presente em um órgão. Fundamentalmente, displasia é uma reação do epitélio a injúria, fazendo com que o epitélio normal sob estímulo sofra alterações morfológicas e apresente atipias celulares (MATTOS, 2004).

Displasia é encontrada principalmente no epitélio, e se caracteriza por alterações que incluem perda da uniformidade das células individuais e da sua orientação arquitetural. As células displásicas também exibem pleomorfismo e núcleos hipercromáticos anormalmente grandes em relação a seu tamanho. Quando as alterações displásicas são acentuadas e envolvem toda a espessura do epitélio, mas permanecem confinadas ao tecido normal, são consideradas neoplasma pré-invasivo, denominado *carcinoma in situ*. Quando as células tumorais se movem além dos limites normais, o tumor é denominado *invasivo* (KUMAR et al., 2005).

As alterações displásicas são freqüentemente adjacentes aos focos do carcinoma invasivo, e em algumas situações, como a de fumantes de longa duração e de esôfago de Barrett, uma displasia epitelial grave precede freqüentemente o aparecimento do câncer. No entanto displasia não evolui obrigatoriamente para câncer. Alterações leves a moderadas que não envolvem toda a espessura do epitélio podem ser reversíveis, e, com a remoção dos fatores que lhes dão origem, o epitélio pode voltar ao estado normal (KUMAR et al., 2005).

RIDDELL et al. (1983) definem displasia em RU como “alteração neoplásica inequívoca do epitélio cólico”. Dessa forma, o epitélio displásico não somente

pode ser marcador ou precursor do carcinoma, mas também pode, por si só, ser maligno e associado com invasão direta no interior do tecido.

A identificação da displasia baseia-se na combinação de dois grupos de achados microscópicos (RIDDELL et al., 1983):

- 1) alterações arquiteturais excedendo o que resulta de reparo na colite crônica, freqüentemente assemelhando-se ao arranjo glandular dos adenomas;
- 2) anormalidades citológicas – pleomorfismo celular e nuclear, hipercromatismo nuclear, perda da polaridade nuclear e marcada estratificação do núcleo.

2.3.2 Displasia – Histórico

CROHN e ROSENBERG (1925) documentaram um caso de carcinoma retal associado com RU e postularam que a lesão se desenvolvia como seqüela tardia da doença. O risco de carcinoma aumenta com a duração da doença e é maior em pessoas com colite ulcerativa extensa (DEVROEDE; TAYLOR; SAUER, 1971; MORSON; PANG, 1967; RIDDELL, 1976); assim, é maior em pessoas com pancolites com 10 anos ou mais de evolução. Esse risco aumenta 20% a cada década após dez anos (DEVROEDE; TAYLOR; SAUER, 1971; KEWENTER; AHLMAN; HULTEN, 1978).

O fenômeno biológico e morfológico da displasia foi pela primeira vez postulado como precursor do adenocarcinoma em RU por WARREN e SOMMERS (1949).

COUNSELL e DUKES (1952) notaram apresentação macroscópica atípica do adenocarcinoma e a raridade de pólipos adenomatosos em portadores de RU de longa data. Segundo eles, o adenocarcinoma freqüentemente se desenvolve sem lesão visível ou reconhecível na superfície mucosa.

MORSON e PANG (1967) demonstraram que a displasia, freqüentemente difusa, ocorre em mucosa plana (não polipóide) e pode ser detectada na biópsia.

A evidência que suporta o conceito de displasia como indicador de malignidade na colite ulcerativa baseia-se em duas observações. A primeira diz

respeito à análise retrospectiva do cólon ressecado por tumor em portadores de RU que freqüentemente apresentavam displasia (MORSON; PANG, 1967; HULTEN; KEWENTER; AHREN, 1972; FENOGLIO; PASCAL, 1973; YARDLEY; KEREN, 1974; COOK; GOLIGHER, 1975; GEWERTZ; DENT; APPELMAN, 1976; NUGENT et al., 1979; FUSON et al., 1980). A segunda evidência está baseada em estudos de pacientes submetidos à colectomia por displasia, freqüentemente coexistente com adenocarcinoma (MORSON; PANG, 1967; MYRVOLD; KOCK; AHREN, 1974; DOBBINS, 1977; LENNARD-JONES; MORSON; RITCHIE, 1977; NUGENT et al., 1979; FUSON et al., 1980; BLACKSTONE et al., 1981).

Em anos recentes o interesse foi focado na displasia do epitélio do intestino grosso como marcador histológico do aumento do risco de câncer, dessa forma utilizada como potencial indicador para colectomia (GORFINE et al., 2000).

2.3.3 Displasia – Classificação da mucosa cólica quanto à presença de displasia

Padronizada e publicada por RIDDELL et al. (1983), sua classificação da mucosa cólica quanto à displasia em doença inflamatória intestinal é citada como modelo. São três grandes categorias – *negativa*, *indefinida* e *positiva* –, cujo desdobramento é mostrado no quadro 1.

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO DA MUCOSA CÓLICA QUANTO À DISPLASIA EM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

NEGATIVA
Mucosa normal
Colite quiescente
Colite ativa
INDEFINIDA
Provavelmente negativa (provavelmente inflamatório)
Desconhecida
Provavelmente positiva (provavelmente displasia)
POSITIVA
Displasia de baixo grau
Displasia de alto grau

Fonte: RIDDELL et al., 1983

2.3.3.1 Mucosa negativa para displasia

2.3.3.1.1 Mucosa normal

Epitélio do intestino grosso normal pode ser visto próximo à área de acometimento da colite ulcerativa e ocasionalmente nas biópsias de colite quiescente nas quais os fatores tipicamente regenerativos não estão aparentes. Algumas invaginações são normais e não devem ser confundidos com distorção críptica. Não se encontra atipia nuclear (RIDDELL et al. 1983).

2.3.3.1.2 Colite quiescente

Em longo tempo de doença severa existe a redução do número de criptas por unidade de área (atrofia). As criptas podem ser distorcidas e estão frequentemente afastadas da muscular da mucosa. Podem ser achados focos de metaplasia de células de Paneth distal ao ângulo direito do cólon, de metaplasia pilórica e de hiperplasia de células endócrinas. É freqüente o aumento das células inflamatórias crônicas e podem ser vistos focos de atividade da doença. Atipia nuclear está ausente (RIDDELL et al., 1983).

2.3.3.1.3 Colite ativa

Constante inflamação e regeneração levam à depleção de muco. Portanto depleção de muco resultante de inflamação aguda é um fator que deve ser excluído antes de ser considerado diagnóstico de displasia.

Na fase regenerativa ou de reparo surgem ramificações crípticas e ocasionalmente configuração vilosa da superfície, persistência da depleção de muco e mudanças nucleares nas células epiteliais. A fase inicial de regeneração pode ser distinguida da displasia por não aumentar o número de células epiteliais e por ter o citoplasma freqüentemente atenuado e a cromatina nuclear esparsa e finamente distribuída. No estágio mais tardio de reparo essa diferenciação pode ser mais difícil, porque as células epiteliais apresentam núcleos alargados e mostram graus variáveis de estratificação e hipercromatismo, além de mais mitoses (RIDDELL et al., 1983).

2.3.3.2 Mucosa indefinida para displasia

Na interpretação das biópsias pode ser impossível avaliar a existência de displasia, devido ao padrão de crescimento epitelial adicional, a atividade inflamatória e regenerativa e a alguns fatores de processamento técnico (e.g., defeitos de fixação, processamento e artefatos de coloração).

Os casos indefinidos para displasia podem ser subdivididos naqueles decorrentes somente da inflamação (provavelmente negativos); naqueles com alterações mais típicas mas não inequívocas de displasia (provavelmente positivos) e naqueles que não permitem razoável estimativa (desconhecidos) (RIDDELL et al., 1983).

2.3.3.2.1 Provavelmente negativa

Quando o processo de reparação atinge o ponto em que o epitélio é colunar, as chances de confusão com displasia aumentam. Nesse estágio o núcleo adquire um pouco mais de cromatina, particularmente ao redor das membranas nucleares; torna-se alongado e podem apresentar nucléolo eosinofílico e proeminente. Se os núcleos são numerosos e marcadamente estratificados, a sua aparência pode assemelhar-se ao epitélio displásico. Na mucosa em que se processa o reparo, pode-se observar a transição entre o epitélio regenerativo e o epitélio não ulcerado, na mesma cripta ou nas criptas adjacentes. Com base nesses critérios é geralmente possível atribuir as alterações epiteliais ao processo normal de reparação. Mas se dúvida persistir, é melhor classificar os achados como indefinidos para displasia e provavelmente negativos. As alterações reparativas podem ser particularmente exuberantes na criança e no adulto jovem; portanto, cuidado especial deve ser observado nesses pacientes (RIDDELL et al., 1983).

2.3.3.2.2 Desconhecida

O mais importante desse padrão é a falha do epitélio críptico dentro da maturação normal dos tipos celulares, o que é chamado de *maturação incompleta das criptas*. Pode haver nas criptas marcada redução no número de células produtoras de muco e, focalmente, ausência dessas células. Assim, as criptas contêm

somente células absortivas ou células relativamente indiferenciadas encontradas somente na base da cripta (RIDDELL et al., 1983).

2.3.3.2.3 Provavelmente positiva

Essa categoria inclui casos altamente suspeitos de displasia e indica que mais biópsias são necessárias. Os núcleos epiteliais podem ser grandes e hipercromáticos e às vezes apresentar pequena estratificação, mas essas alterações são insuficientes para aceitar como inequivocamente displásica a mucosa (RIDDELL et al., 1983).

2.3.3.3 Mucosa positiva para displasia

Por definição, essa categoria inclui somente casos inequívocos de mucosa displásica. O diagnóstico então indica que a lesão pode estar associada com adenocarcinoma invasivo ou este pode subsequente manifestar-se. Displasia pode ser de baixo e de alto grau, devido a diferentes implicações no manejo dos pacientes (RIDDELL et al., 1983).

2.3.3.3.1 Displasia de baixo grau

Muitos espécimes de biópsias com displasia de baixo grau apresentam certa facilidade de diagnóstico devido a sua similaridade com adenomas tubulares. É o que se observa nas criptas alongadas e revestidas por epitélio colunar alto, com alguma produção de muco. O núcleo está aumentado, usualmente hipercromático com estratificação nuclear. No diagnóstico de displasia de baixo grau o núcleo deve estar confinado à metade basal das células. Há falha na maturação e na diferenciação em células caliciformes e absortivas no epitélio superficial da mucosa (PASCAL, 1994).

Em muitos casos a displasia de baixo grau está acompanhada de proeminente distrofia de células caliciformes, hiperplasia de células endócrinas e metaplasia de células de Paneth.

Aumento na graduação de baixo para alto grau de displasia baseado somente na aparência de alto grau de displasia de uma ou duas criptas é, provavelmente, injustificável (RIDDELL et al., 1983).

2.3.3.3.2 Displasia de alto grau

Na maioria dos casos, os achados do epitélio são rigorosamente parecidos aos adenomas em pacientes sem colite em que o diagnóstico é relativamente fácil e a distinção com displasia de baixo grau é dependente primariamente do grau das alterações histológicas. Ao contrário da displasia de baixo grau, na qual os núcleos estão distribuídos regularmente na metade basal das células, a maioria dos casos de displasia de alto grau mostra estratificação nuclear que se estende até a superfície das células. Outro critério para definir displasia de alto grau é a proeminente hipercromasia, pleomorfismo e maior perda da polaridade nuclear (RIDDELL et al., 1983).

2.3.4 Displasia – Modificação da Classificação da Mucosa Cólica quanto à Presença de Displasia

RIDDELL (1996) modificou a classificação original em que, na categoria *indefinido para displasia*, foi retirado o *provavelmente negativo* por ser de pouca ocorrência e estar associado somente à inflamação. As categorias *desconhecido* e *provavelmente positivo* foram unificadas, já que em ambas o resultado prático implicava repetir a endoscopia para mais biópsias. Portanto a categoria *indefinido para displasia* já não é subdividida.

2.3.5 Displasia – Displasia Associada com Lesão ou Massa (DALM)

O termo DALM é utilizado para designar lesão ou massa cólica, associada com displasia, em portadores de RU crônica (ODZE, 1999). Existe um subtipo específico de DALM que é endoscópico e histologicamente parecido com adenoma. Essa distinção é importante, pois o adenoma tipo DALM é tumor que resulta de colite crônica e tem indicação de colectomia. No entanto o adenoma esporádico é, por definição, pólipio displásico e usualmente tratado com polipectomia. O adenoma

coexistente com RU encontra-se em área sem colite, pois displasia associada com RU não se desenvolve sem inflamação crônica do epitélio. Lesões polipóides displásicas associadas com RU ocorrem dentro de áreas de colite e são associadas com lesões sincrônicas ou metacrônicas de displasia ou adenocarcinoma. Os fatores moleculares (*p53* e betacatenina) auxiliam na caracterização do pólipo. Adenoma habitualmente apresenta na imunoistoquímica *p53* negativo e betacatenina positiva, ao passo que DALM, habitualmente, apresenta *p53* positivo e betacatenina negativa. Além do adenoma e do DALM, um terceiro grupo de pólipos chamados *indeterminados* são identificados. Estes consistem em lesões encontradas em áreas de colite mas não estão associados com displasia ou adenocarcinoma (ODZE, 1999).

2.3.6 Displasia – Concordância Diagnóstica

GUINDI e RIDDELL (2001) relatam que, em relação aos portadores de RU, existe variação na concordância entre os patologistas quanto ao diagnóstico e à graduação da displasia cólica. Essa variação é pequena quando se distingue entre negativo para displasia e displasia de alto grau. A concordância é maior para a presença ou ausência de displasia do que para graduação da displasia.

2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GENE *P53* SUPRESSOR DE TUMOR

O gene *p53*, originalmente descrito em 1979 (LANE; CRAWFORD, 1979), tem sido responsabilizado por uma série de funções regulatórias no desenvolvimento celular. Ele age como supressor de tumor típico, ou seja, bloqueia a proliferação celular. Quando mutado, é o gene mais freqüentemente associado ao desenvolvimento de neoplasias malignas, pois desempenha papel importante nas vias de carcinogênese de diferentes tipos de tecidos (NIGRO et al., 1989).

O gene *p53*, o mais conhecido ou compreendido entre todos aqueles arrolados na carcinogênese (GOTTLIEB; OREN, 1996; KO; PRIVES, 1996), localiza-se no braço curto do cromossomo 17 e codifica no homem proteína nuclear com 393 aminoácidos. A proteína tem peso molecular de 53 000 dáltons – do que deriva o nome *p53* – e funciona como fator de transcrição dependente do DNA, com o qual

interage (FIELDS; JANG, 1990). Vários dados na literatura sugerem que o *p53* age como protetor das células após dano genômico. Alguns danos ao DNA ativam o *p53*, estacionando o ciclo celular. Isso permite que o DNA seja reparado, impedindo que mutações potencialmente danosas sejam transferidas para as células-filhas. Como via alternativa, o *p53* pode induzir a apoptose celular, com resultado final semelhante. Não é sem motivo, portanto, que o *p53* vem sendo chamado “o guardião do genoma” (LANE, 1992).

2.4.1 Mecanismos pelos Quais o *P53* Induz a Suspensão do Ciclo Celular e a Apoptose

Quando ocorre o dano ao DNA, ativa-se o gene *p53*. A proteína *p53*, na seqüência, induz a transcrição do gene *p21^{WAF1/CIP1}*, com produção da proteína *p21*. Esta inibe as ciclinas dependentes de quinases, necessárias para que haja progressão da fase *G₁* para *S* ou de síntese do DNA, quando a célula está prestes a dividir-se, ainda com 46 cromossomos (WALDMAN; KINZLER; VOLGESTEIN, 1995). Existem evidências de que o mecanismo que interrompe o ciclo celular pela via do *p53* é mediado pela indução do *p21^{WAF1/CIP1}*. Há também indícios de que a apoptose dependente do *p53* está relacionada à modulação da função do oncogene *Bcl-2*. Em algumas linhagens celulares, a expressão do *p53* ativa a transcrição do *Bax*, membro da família *Bcl-2* (MIYASHITA; REED, 1995). O *Bax* promove a apoptose, enquanto o *Bcl-2* reprime o processo. Os níveis relativos das duas proteínas parecem determinar o destino da célula (OLTVAI; MILLIMAN; KORSMEYERQ, 1993). A indução do *Bax* pelo *p53*, após dano genômico, desencadearia a apoptose. Se nessas circunstâncias o *p53* se encontrasse mutado, ou seja, ineficaz, seria possível a continuidade do ciclo celular, passando mutações somáticas, induzidas pelo agente patológico, às células-filhas.

As alterações do *p53* determinam a produção, no núcleo celular, de uma proteína modificada estruturalmente e com meia-vida longa que se acumula. Dessa forma, por imunoistoquímica, pode-se determinar a superexpressão da proteína.

2.4.2 Atuação do *p53* no Câncer Colorretal

A mutação da proteína *p53* é encontrada em cerca de 50% de todos os tumores humanos. A detecção do *p53* intranuclear foi descrita como fator prognóstico negativo em diferentes tipos de tumores – como de mama, pulmão, rim, bexiga, endométrio, ovário, estômago e tecidos moles –, orientando na determinação de populações que deverão receber quimioterapia, como ocorre em protocolos de câncer de mama (SILVESTRINI et al, 1993; GALLEG0 et al., 2000).

Entre 50% e 75% de todos os tumores colorretais apresentam perda da função de ambos os alelos do gene *p53* (GREENBLATT et al., 1994). Em geral, isso decorre de mutação de um alelo e perda do outro por deleção de uma região extensa do DNA cromossômico. Embora muitos cânceres apresentem mutações nos alelos do gene *p53*, elas são muito menos freqüentes nas fases iniciais da carcinogênese e mais raras em adenomas. AHNEN (1999) relata a ocorrência de mutação no gene *p53* em 80% a 90% dos tumores colônicos esporádicos e em 20% a 40% dos adenomas. O mesmo autor correlaciona a proteína mutante nesses últimos com a severidade da displasia, embora reconheça a ocorrência da proteína com freqüência menor também no epitélio com displasia de baixo grau.

YAMAGUCHI et al. (1995), pesquisando carcinomas escamocelulares no ânus, encontraram a proteína mutada em 52,5% (21/40) das peças estudadas por imunohistoquímica, e negativa no grupo controle, constituído por peças cirúrgicas de hemorroidectomias.

No relato de FINLAY et al. (1988), a análise imunohistoquímica da proteína *p53* mutada apontou níveis intracelulares altos em comparação ao achado nas células normais nas quais a proteína não foi detectada. Provavelmente os altos níveis encontrados sejam devidos ao aumento da meia-vida da proteína mutada.

Das mutações do gene *p53*, 94% ocorrem na área de domínio da proteína no DNA, entre os aminoácidos 120 a 290, éxons 5 a 8. A maioria dessas mutações encontram-se em quatro seqüências peptídicas, altamente conservadas através das espécies, e correspondem a segmentos responsáveis por ligações de seqüências específicas do DNA. Cerca de 80% das mutações ocorridas no *p53* são do tipo de substituição (*missense mutation*), ao contrário das de truncagem (*nonsense ou frameshift*), que resultam em proteínas truncadas, as quais transcrevem para um códon de parada de transcrição (*stop codon*). Portanto a maioria dos cânceres com

p53 mutante expressam proteínas de comprimento normal, mas funcionalmente deficientes quanto à ligação com o DNA (LEVINE et al., 1995).

A expressão da proteína *p53* no desenvolvimento dos tumores esporádicos do cólon parece ser um evento tardio, ou seja, parece ocorrer durante a conversão do adenoma para carcinoma (BAKER et al., 1990; YAMAGUCHI et al., 1995). No entanto há estudos demonstrando que na polipose adenomatosa familiar as mutações no *p53* podem ocorrer também no desenvolvimento do adenoma (SHIRASAWA et al., 1991). Da mesma forma alguns estudos colocam a mutação do *p53* como evento precoce na carcinogênese dos portadores de RU (BRETNALL et al., 1994; LASHNER et al., 1999).

2.4.3 Uso Clínico da Identificação do *p53* Mutante

Há vários usos clínicos potenciais em neoplasias malignas. As mutações no gene *p53* podem ser determinadas por imunoistoquímica ou por seqüenciamento do DNA. Como já mencionado, a alteração da configuração original dessa proteína resulta numa forma mutante com produto protéico estável, o que aumenta sua vida média e permite a detecção mais simples por meio de anticorpos, segundo técnicas de imunoistoquímica, já que o seqüenciamento do DNA envolve técnicas laboratoriais mais complexas (FINLAY et al., 1988; RAWET, 1993). Já a forma normal (*wild type*) tem vida média muito curta, o que faz com que os níveis tissulares sejam baixos, dificultando a identificação com anticorpos (PIGNATELLI et al., 1992).

A positividade da reação de imunoistoquímica varia na dependência do anticorpo utilizado. BASS et al. (1994) compararam seis diferentes anticorpos disponíveis comercialmente e concluíram que o anticorpo monoclonal DO7 foi o mais sensível e específico.

YIN et al. (1993) avaliaram o gene *p53* usando conformação de polimorfismo de cadeia simples, seqüenciamento de DNA e perda da heterozigose em 45 portadores de RU com displasia ou carcinoma. Mutações ponto foram detectadas em 26 lesões de 20 pacientes, incluindo 18 carcinomas, 6 DALMs, 1 displasia plana e 1 metástase em linfonodo. Mutações do tipo *missence* causando substituição de aminoácidos, assim como mutações *nonsense* resultando em *stop codons* prematuro foram observadas. Mutações ponto foram acompanhadas da perda do outro alelo do gene *p53* em 8 dos 10 pacientes. Esses achados sugerem que a inativação

do *p53* por mutação ou perda da heterozigose é mecanismo comum de transformação maligna na RU. Em contraste com o câncer colorretal esporádico, na RU com alterações neoplásicas a inativação do *p53* é relativamente precoce.

YOSHIDA et al. (2003), a partir de três espécimes cirúrgicos de pacientes com RU, isolaram 11 criptas regenerativas e 76 criptas de 7 casos de DALM. Realizada coloração imunoistoquímica para *p53*, extraíram o DNA das criptas coradas com *p53* por microdissecção, amplificação por PCR e seqüenciamento para identificação de mutações nos éxons 2 até 11. A coloração de toda ou da metade inferior da cripta, considerada positiva para a superexpressão da proteína *p53*, foi encontrada em 11 das 20 criptas com mutação do gene *p53* (55%) com alteração de aminoácido. Entretanto mutação ponto do *p53* foi detectada em 13 das 37 criptas positivas para superexpressão da *p53* (35,1%).

A detecção da proteína *p53* mutante parece conferir prognóstico pior para os tumores colorretais, tanto na sobrevida quanto nos índices de recidiva. Essa associação tem ocorrido independentemente de outros fatores, incluindo idade, estadiamento ou ploidia tumoral (HAMELIN et al., 1994; HAMELIN; LAURENT-PUIG, 1997; RIBEIRO JR. et al., 2000). GALLEGO et al. (2000), estudando 126 casos de câncer colorretal, demonstraram relação direta entre o achado do *p53* mutante e o tempo livre de doença. No entanto não encontraram correspondência com o tempo de sobrevida, nem com os outros fatores prognósticos usualmente considerados, como tamanho e localização do tumor, grau de infiltração, invasão neural e vascular.

WONG et al. (2000) realizaram estudo imunoistoquímico com marcador de proliferação celular, o *Ki67*, e a expressão do regulador do ciclo celular, a *p53*. Foram estudadas atipias regenerativas (AR, n=22), indefinidas para displasia (ID, n=12), displasia de baixo grau (DBG, n=22) e displasia de alto grau (DAG, n=14). Todos os casos de displasia mostraram extensão do *Ki67*, corando acima do terço basal da cripta. Moderada intensidade da coloração do *p53* foi visto em 10 dos 22 casos de AR, mas intensidade forte da coloração foi vista somente nos casos de displasia. Todos os casos de DAG mostraram extensão do *Ki67* e da *p53*, corando acima dos dois terços basais da cripta. A conclusão é de que um *Ki67* restrito ao terço basal da cripta exclui o diagnóstico de displasia, ao passo que uma coloração forte da *p53* sugere o diagnóstico de displasia.

HOLZMANN et al. (2001) analisaram biópsias de 83 portadores de RU de longo tempo de evolução, que faziam parte de um programa de seguimento

endoscópico. Foram analisadas nas biópsias: aneuploidia de DNA, displasia, *p53* e *Ki-ras*. Aneuploidia do DNA foi encontrada em 32,5%, displasia em 22,9%, *p53* em 21,7% e mutações do *Ki-ras* em 18,1% dos pacientes. Nenhum desses marcadores foi encontrado no grupo controle. Associação estatisticamente significativa foi encontrada entre displasia e aneuploidia do DNA e entre displasia e mutações do *p53*. Nenhuma associação significativa foi encontrada quando se relacionou somente displasia com mutação do *Ki-ras*.

LASHNER et al. (1999) estudaram os espécimes de biópsias para mutações do *p53* em 95 portadores de RU com pancolite de longa data (mais de 8 anos) que tinham diagnóstico de displasia ou câncer. A probabilidade de apresentar displasia ou câncer foi significativamente maior entre os 37 pacientes que apresentavam *p53* positivo. As mutações do *p53* desenvolveram-se, aproximadamente, 8 meses antes da displasia de baixo grau, 26 meses antes da de alto grau e 36 meses antes do câncer.

LASHNER et al. (2003) estudaram a expressão do *p53* em 75 portadores de RU que desenvolveram câncer colorretal. Na pesquisa, feita por imunoistoquímica usando o anticorpo DO-7 anti-*p53*, o tumor era considerado positivo se pelo menos 5% dos núcleos tivessem coloração forte. Foram encontrados 38 pacientes *p53* positivos (50,7%). Na comparação dos 14 pacientes *p53* positivos que morreram do tumor, com os 5 pacientes *p53* negativos houve diferença estatística ($p < 0,04$). O risco relativo de câncer relacionado com morte entre pacientes com tumor *p53* positivo foi de 3,03 (95% CI=1,05-8,73).

ILYAS e TALBOT (1995) pesquisaram *p53* por imunoistoquímica estudando 10 pacientes com displasia presente, no mínimo, 1 ano antes da colectomia. Usaram o anticorpo monoclonal DO7, específico para ambos os tipos, mutante e selvagem, e fizeram a leitura do resultado por contagem de células positivas (0=menos de 10%; +=10-25%; ++=25-50% e +++=>50%). Dos 10 casos, 7 foram positivos; 2 desses 7 tinham *p53* positivo em espécimes antes do desenvolvimento do carcinoma ou displasia; os outros 5 foram negativos para displasia entre 1 e 4 anos antes da cirurgia. Baseados nesses resultados, os autores concluem que a superexpressão da *p53* é evento tardio no desenvolvimento da carcinogênese colorretal em portadores de RU.

ISHITSUKA, KASHIWAGI e KONISHI (2001) verificaram a instabilidade de microssatélites (IMS) e a expressão da *p53* em 75 amostras de 16 espécimes

cirúrgicos. Cinco pacientes tinham longo tempo de duração da doença (maior ou igual a 5 anos) com displasia ou câncer, 7 tinham longo tempo de evolução da doença sem alterações displásicas e 4 curto tempo de evolução da doença (menor do que 5 anos) sem displasia. O grupo com displasia teve 17 lesões (6 com DBG, 7 com DAG e 4 com carcinoma). No grupo sem displasia a IMS foi detectada mais significativamente em pacientes com inflamação severa do que naqueles com moderada. IMS com 2 locos ou mais foi encontrado em 3 das 17 lesões. A superexpressão da *p53* foi encontrada em 11 dos 17 casos. A influência da inflamação deve ser considerada quando vamos estimar IMS em RU.

BRUEWER et al. (2002) usaram metalotioneínas juntamente com a *p53* para investigar seus papéis na carcinogênese da RU em 14 pacientes com carcinoma colorretal, 13 com DAG, 10 com DBG e 30 sem displasia nem carcinoma. Positividade da coloração imunoistoquímica da metalotioneína foi mais freqüente para epitélio não displásico e DBG, do que para DAG e adenocarcinoma ($p < 0,01$). Imunorreatividade *p53* positiva foi observada predominantemente em DAG e adenocarcinoma, quando comparada com DBG e epitélio não displásico ($p < 0,01$).

NOFFSINGER et al. (2001) determinaram um padrão basal de expressão da *p53* associado com a mutação do gene *p53*. Quarenta e dois pacientes com RU foram avaliados para imunoistoquímica da *p53* em 130 casos de epitélio sem displasia, 8 indefinidos para displasia, 28 com displasia e 9 com carcinoma. As criptas *p53* positivas, coradas com imunoistoquímica para *p53* e *p21^{waf1/cip1}*, foram microdissecadas para extração do DNA; as mutações foram avaliadas por conformação de polimorfismo de cadeia simples e por seqüenciamento direto dos produtos da PCR dos éxons 5 ao 9. A detecção da perda da heterozigose foi realizada em 5 pacientes com amplificação do DNA em 2 locos microsatélites, adjacentes ao *p53*. Os autores encontraram positividade difusa da *p53* nos casos de displasia (17,9%) e de adenocarcinoma (66,7%); positividade basal em epitélio sem displasia (5,2%), indefinido para displasia (12,5%) e displásico (10,7%). Áreas fortemente positivas para *p53* foram amplamente negativas para *p21*. Mutações do *p53* foram identificados em 6 dos 8 casos fortemente corados da *p53*. Nenhum dos casos fracamente positivos continha mutações.

BRENTNALL et al. (1994), em 14 espécimes de colectomia por adenocarcinoma ou displasia com RU, avaliaram aneuploidia, perda da heterozigose do *p53* e mutação do códon 248 no éxon 7 do *p53*. Encontraram mutações em 83% (5 de 6)

dos espécimes com adenocarcinoma, em 48% (23 de 48) com displasia, em 3% (1 de 34) dos indefinidos para displasia e em 29% (5 de 17) em amostras sem displasia. Perda da heterozigose foi encontrada predominantemente em áreas de DAG e adenocarcinoma. Concluem que a mutação do *p53* está fortemente relacionada com aneuploidia.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 CASUÍSTICA

Foi realizada pesquisa retrospectiva, a partir de 2004, de 124 casos de indivíduos com diagnóstico clínico e endoscópico de retocolite ulcerativa em acompanhamento no Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, que haviam sido submetidos a exame anatomopatológico da mucosa cólica. No banco de dados do Serviço de Anatomia Patológica do mesmo hospital foram verificados os cadastros desses 124 pacientes e os respectivos exames. Os pacientes tiveram seus prontuários revisados para levantamento dos dados clínicos – idade, sexo, cor, tempo de evolução da doença até o momento do exame e extensão da doença. Os exames anatomopatológicos incluíam biópsias endoscópicas e peças cirúrgicas.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e está registrado no Sistema de Banco de Pesquisas (BANPESQ) sob o número 2003013073.

Foram selecionados os laudos anatomopatológicos em que constasse menção de:

- a) *indefinido para displasia*;
- b) *presença de displasia*;
- c) *adenocarcinoma*.

O estudo histopatológico foi feito pelo mestrando e orientado por patologista especializado em sistema digestório seu orientador, em todas as etapas de revisão das lâminas.

Os pacientes que apresentavam displasia, lesões indefinidas para displasia ou adenocarcinoma foram submetidos às reações de imunoistoquímica para a proteína nuclear *p53*.

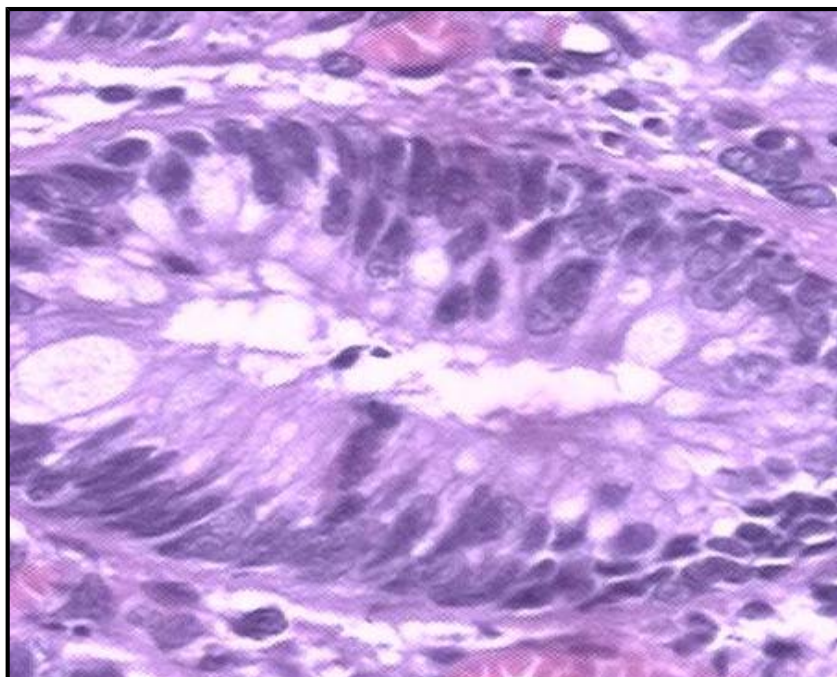
3.2 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

O material de arquivo, previamente fixado em solução aquosa de formol a 10%, foi recebido pelo Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, e submetido a processamento. As cápsulas foram acondicionadas num processador automático de tecidos, que realizou a desidratação, a diafanização e a impregnação com parafina fundida. Incluíram-se os espécimes em parafina para a realização de cortes com micrótomo em amostras de 4-5 μm . O material foi corado com hematoxilina-eosina (HE) (BANCROFT; STEVENS, 1977; MICHALANY, 1980; SPENCER, 1982).

3.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS DISPLASIAS

Os casos *indefinidos para displasia* e *com presença de displasia* foram revisados com base em classificação discriminativa para caracterizar as atipias como displasia ou reparo. A classificação está reproduzida na forma de tabela didática no livro de patologia *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology* (PETRAS, 2004) (apêndice 1). Após a revisão, os laudos dos exames anatomopatológicos foram classificados em *com displasia* ou *sem displasia* (figura 1).

FIGURA 1 – ÁREA DE DISPLASIA



FONTE: Serviço de Anatomia Patológica da UFPR

NOTA: Núcleos displásicos corados em azul escuro. HE 400x

3.4 PROCESSAMENTO IMUNOISTOQUÍMICO

Todas as reações foram realizadas na Unidade de Imunoistoquímica do Hospital de Clínicas da UFPR. O procedimento imunoistoquímico foi o padrão:

PREPARAÇÃO DOS CORTES HISTOLÓGICOS (DESPARAFINIZAÇÃO E HIDRATAÇÃO):

As lâminas com cortes de parafina são colocadas na estufa a 37°C, pelo período noturno (*overnight*) para que a parafina derreta e em xilol por 10 minutos. As secções de parafina são hidratadas com banhos consecutivos em soluções com concentração decrescente de álcool, a partir de álcool absoluto, até 90%, permanecendo um minuto em cada uma.

RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA: As amostras fixadas em formalina, especialmente quando não tenha sido possível o controle de pH ou do tempo de fixação, requerem recuperação antigênica para a grande maioria dos epitopos pesquisados. O método empregado foi a incubação em calor úmido, em que as lâminas são incubadas em tampão citrato pH 6, durante 20 minutos e depois resfriadas por 20 minutos.

BLOQUEIO DA PEROXIDASE ENDÓGENA: Realizado com solução de peróxido de hidrogênio a 6%, por 3 minutos. Segue-se lavagem com água corrente e destilada.

ANTICORPO: Nesta pesquisa foi usado anticorpo monoclonal de camundongo contra proteína *p53* em material previamente parafinado numa diluição de 1:100. (DO-7, DakoCytomation Denmark A/S, DN), anticorpo monoclonal classe G2 das imunoglobulinas, que se liga tanto à proteína selvagem quanto à mutada. Foi empregado o adenocarcinoma colorretal como controle positivo.

SISTEMA DE LIGAÇÃO: Envision® DakoCytomation. Uma imunoglobulina do isótipo G anticamundongo impregnada com polímeros de dextran liga-se ao anticorpo DO-7.

REVELADOR: A incubação com o cromógeno DAB® DakoCytomation é realizada em temperatura ambiente. Esse cromógeno marrom liga-se ao dextran.

FINALIZAÇÃO E MONTAGEM DAS LÂMINAS: As lâminas são lavadas e coradas com hematoxilina e depois desidratadas com 2 banhos de álcool absoluto por 5 minutos. Banham-se as lâminas em xilol e aplica-se a lamínula (WEISS L.M., 1997).

3.5 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

Realizou-se a contagem de núcleos corados com marrom por meio de analisador de imagem – Image-Pro Plus® - The Proven Solution™ Versão 4.5.1.23 for Windows 98/NT/ME/2000/XP Copyright © 1993-2002 Media Cybernetics Inc. Foram capturados em grande aumento (400x) todos os campos representativos dos locais de displasia, nos quais se fez a contagem de células positivas e negativas para a expressão da *p53*. As células positivas com os núcleos fortemente corados em marrom foram contadas pelo programa por diferença de cor com os outros núcleos em azul (células negativas). As células epiteliais negativas foram contadas manualmente com marcação na tela do monitor (figuras 2 e 3).

Na avaliação da positividade das reações fez-se uso dos critérios abaixo (ILYAS; TALBOT, 1995):

- negatividade: menos de 10% de células positivas;
- positividade +: imunorreatividade de 10-25%;

- positividade ++: imunorreatividade de 26-50%;
- positividade +++: mais de 50% das células imunopositivas.

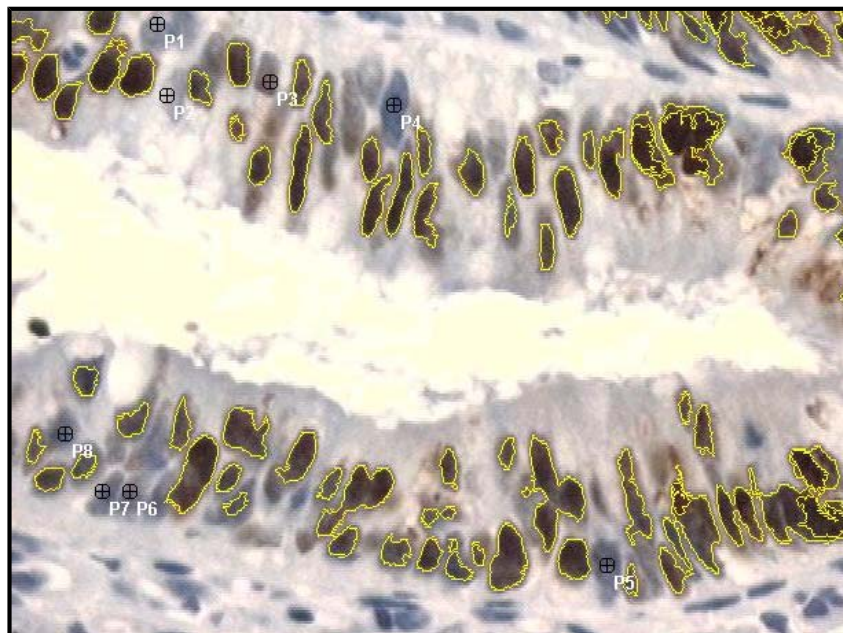
FIGURA 2 – DISPLASIA P53 POSITIVA



FONTE: Serviço de Anatomia Patológica da UFPR

NOTA: Núcleos displásicos corados em marrom antes da marcação para contagem celular. Imunoistoquímica para p53 400x.

FIGURA 3 - DISPLASIA P53 POSITIVA



FONTE: Serviço de Anatomia Patológica da UFPR

NOTA: Mesma área da figura 2 com núcleos displásicos contornados em amarelo, corados em marrom após marcação para contagem celular pelo analisador de imagem. Imunoistoquímica para p53 400x. P= células negativas para p53

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste estudo foram considerados 124 portadores de retocolite ulcerativa, acompanhados por meio de biópsias, registrando-se o tempo entre o início da RU e o momento da identificação da displasia. Pacientes que não apresentaram displasia tiveram seu acompanhamento registrado até a última biópsia. As variáveis do estudo foram: cor, sexo, idade no início da doença, idade na última biópsia e local da doença. As variáveis explicativas foram dicotomizadas, testando-se a hipótese nula de distribuição igual de tempo livre de displasia versus a hipótese alternativa de distribuição diferente de tempo livre de displasia. O teste estatístico considerado foi o de Cox-Mantel. A avaliação do tempo de evolução dos grupos com e sem displasia foi feita pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

4 RESULTADOS

4.1 DISPLASIAS E DADOS CLÍNICOS

Trinta e oito (30,65%) indivíduos do sexo masculino e 86 (69,35%) do sexo feminino; nove (7,26%) negros ou mestiços e 115 brancos (92,74%); idade entre 10 e 81 anos no momento da displasia (no grupo com displasia) ou no momento da última biópsia (no grupo sem displasia). A idade do paciente no início da doença variou de 3 a 79 anos e o tempo de evolução da doença até a última biópsia, de 1 a 36 anos.

Os dados clínicos (idade, idade no início da doença, tempo de doença e número de biópsias) estão representados na tabela 1.

TABELA 1 – VARIÁVEIS DADOS CLÍNICOS

VARIÁVEL	n	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Idade na última biópsia	124	10,00	81,00	39,00	39,71	13,48
Idade início da doença	124	3,00	79,00	32,50	33,90	13,56
Tempo de doença na última biópsia	124	1,00	36,00	5,00	6,81	5,97
Número de biópsia	124	1,00	10,00	3,00	3,60	2,17

FONTE: O autor

Quanto à extensão da doença, 78 (62,90%) indivíduos tinham apenas o cólon esquerdo afetado; 46 (37,09%) tinham pancolite.

Dos 124 pacientes, 12 (9,67%) tiveram DBG. Desses 12, 2 também apresentavam ID e 2 DALM. A concordância com o diagnóstico anterior para displasia ocorreu em 9/12 pacientes (75%). Nenhuma biópsia com displasia de alto grau foi encontrada. Duas pacientes apresentaram adenocarcinoma concomitante com displasia (apêndice 2).

Uma paciente apresentou adenocarcinoma na flexura direita do cólon, após 8 anos de evolução da doença, com estadiamento T2 N0 M0; Astler-Coller B1; Dukes A. Outra apresentou adenocarcinoma retal no qual se viam áreas com células em anel de sinete, após 12 anos de evolução da doença, com estadiamento T2 N1 M0; Astler-Coller C1-2; Dukes C.

4.2 DISPLASIAS E IMUNOISTOQUÍMICA P53

Dos 12 pacientes com displasia, 5 (41,67%) tiveram resultado positivo para *p53* e 7 (58,33%) tiveram resultado negativo. Um paciente com positividade + (24% de células +), 1 com positividade ++ (39% das células) e 3 com positividade +++ (>50% das células).

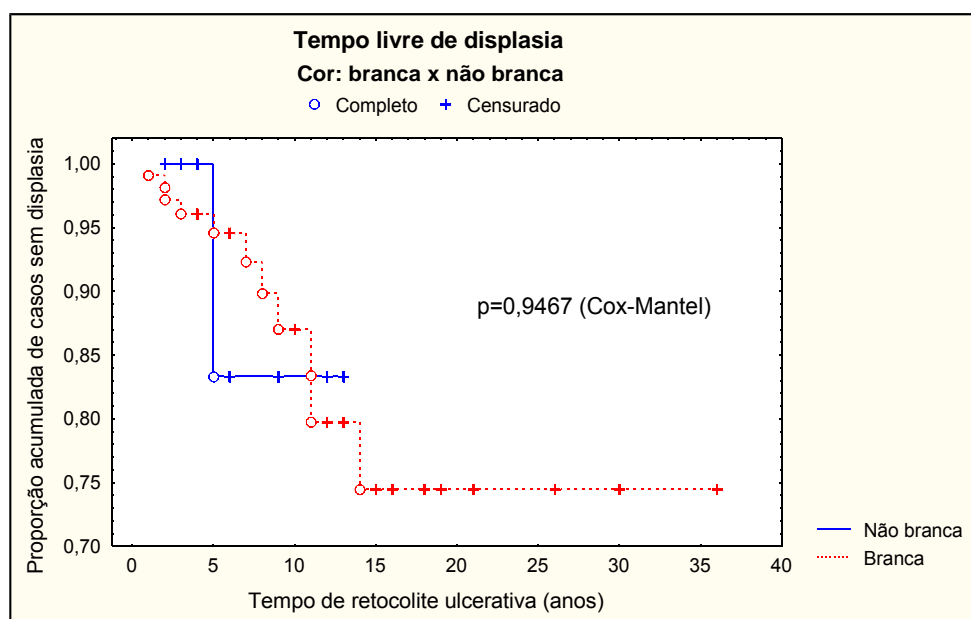
Dois casos de DALM tiveram positividade +++ para *p53*. Três casos de ID tiveram resultado negativo.

A paciente com tumor retal foi *p53* positiva +++; a outra, com tumor na flexura direta do cólon, foi negativa (apêndice 2).

4.3 DISPLASIA E COR DO PACIENTE

Testou-se a hipótese nula de que a distribuição do tempo livre de displasia é igual entre indivíduos de cor branca (11/12) e entre indivíduos de cor não branca (1/12), *versus* a hipótese alternativa de distribuição de tempo livre de displasia diferente. O resultado do teste estatístico indicou a não-rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ($p=0,9467$). No gráfico 1 podem ser observadas as curvas de Kaplan-Meier para os dois grupos (brancos e não brancos).

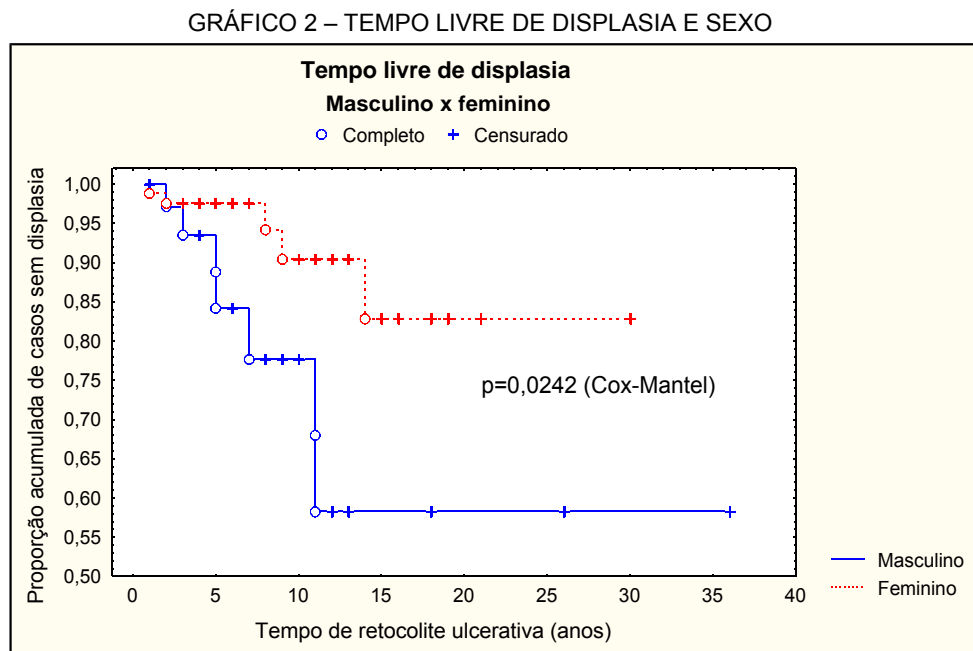
GRÁFICO 1 – TEMPO LIVRE DE DISPLASIA E COR



FONTE: O autor

4.4 DISPLASIA E SEXO DO PACIENTE

Testou-se a hipótese nula de que a distribuição do tempo livre de displasia é igual entre indivíduos do sexo masculino e entre indivíduos do sexo feminino, *versus* a hipótese alternativa de distribuição do tempo livre de displasia diferente. O resultado do teste estatístico indicou a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ($p=0,0242$). No gráfico 2 – onde podem ser observadas as curvas de Kaplan-Meier para os dois grupos – percebe-se que há relativamente maior número de casos de displasia no sexo masculino (7/12) do que no sexo feminino (5/12).

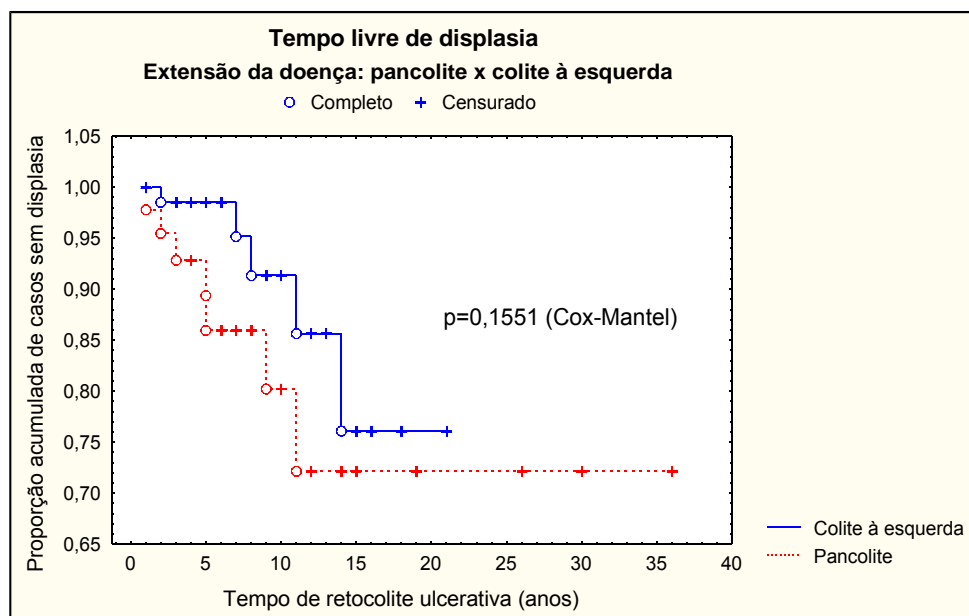


FONTE: O autor

4.5 DISPLASIA E EXTENSÃO DA DOENÇA

Testou-se a hipótese nula de que a distribuição do tempo livre de displasia é igual entre indivíduos com pancolite (7/12) e indivíduos com colite à esquerda (5/12) *versus* a hipótese alternativa de distribuição do tempo livre de displasia diferente. O resultado do teste estatístico indicou a não-rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ($p=0,1551$). No gráfico 3 podem ser observadas as curvas de Kaplan-Meier para os dois grupos (pancolite e colite à esquerda).

GRÁFICO 3 - TEMPO LIVRE DE DISPLASIA E EXTENSÃO



FONTE: O autor

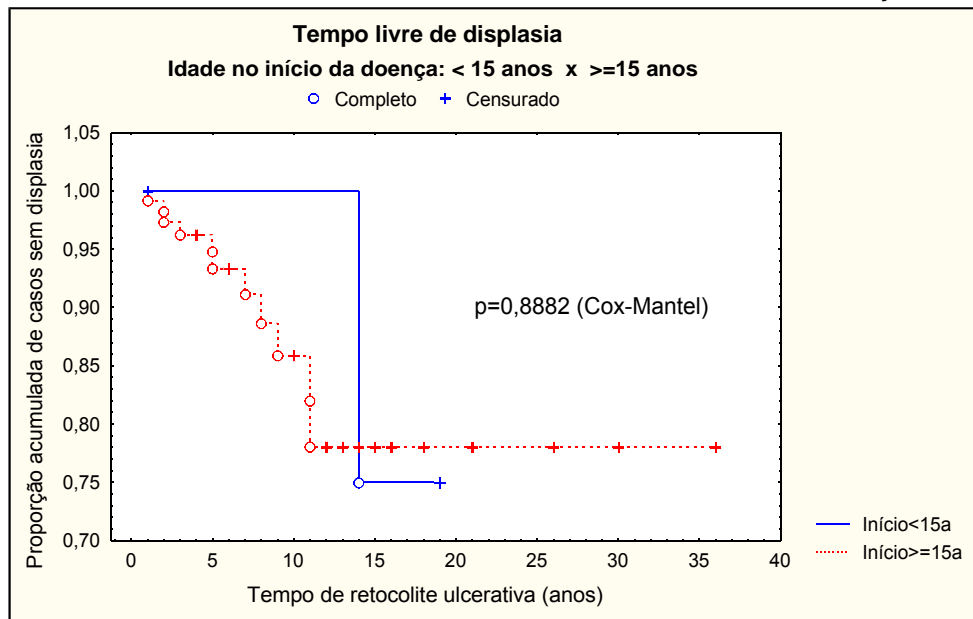
4.6 DISPLASIA E IDADE DO PACIENTE NO INÍCIO DA DOENÇA (<15 ANOS OU ≥ 15 ANOS)

Testou-se a hipótese nula de que a distribuição do tempo livre de displasia é igual entre indivíduos com idade <15 anos no início da doença (1/12) e entre indivíduos com idade ≥ 15 anos no início da doença (11/12) *versus* a hipótese alternativa de distribuição do tempo livre de displasia diferente. O resultado do teste estatístico indicou a não-rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ($p=0,8882$). No gráfico 4 podem ser observadas as curvas de Kaplan-Meier para os dois grupos (<15 anos e ≥ 15 anos no início da doença).

4.7 DISPLASIA E IDADE DO PACIENTE NA ÚLTIMA BIÓPSIA (<40 ANOS OU ≥ 40 ANOS)

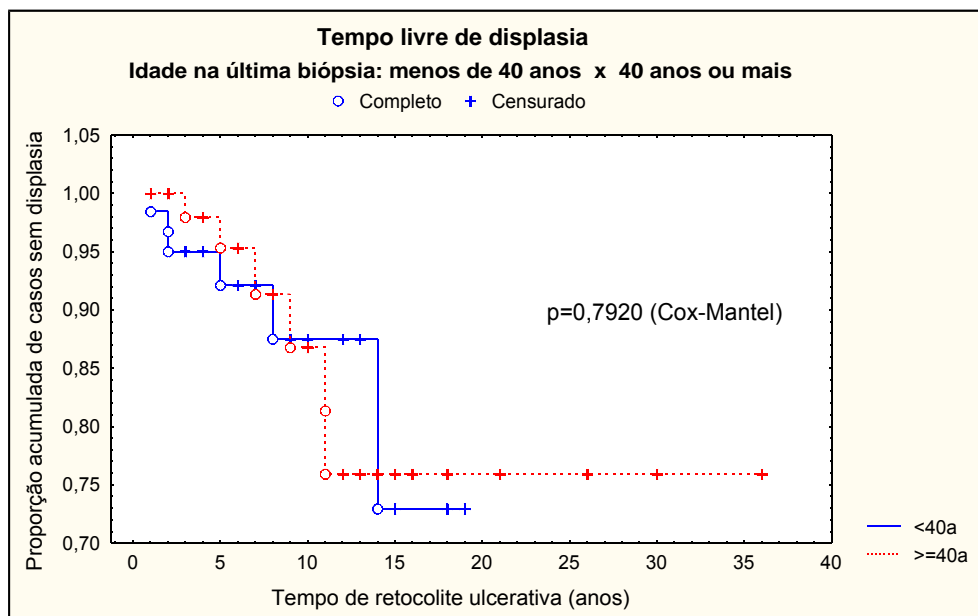
Testou-se a hipótese nula de que a distribuição do tempo livre de displasia é igual entre indivíduos com idade <40 anos na última biópsia (6/12) e entre indivíduos com idade ≥ 40 na última biópsia (6/12) *versus* a hipótese alternativa de distribuição do tempo livre de displasia diferente. O resultado do teste estatístico indicou a não-rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ($p=0,7920$). No gráfico 5 podem ser observadas as curvas de Kaplan-Meier para os dois grupos (<40 anos e ≥ 40 anos de idade na última biópsia).

GRÁFICO 4 – TEMPO LIVRE DE DISPLASIA E IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA



FONTE: O autor

GRÁFICO 5 – TEMPO LIVRE DE DISPLASIA E IDADE



FONTE: O autor

4.8 TEMPO DE DOENÇA NOS GRUPOS COM E SEM DISPLASIA

No grupo de indivíduos com displasia, todos apresentavam menos de 15 anos de evolução da RU no momento da biópsia que identificou a displasia. No grupo de indivíduos livres de displasia até a última avaliação registrada, 90,18% apresentavam nessa biópsia menos de 15 anos de evolução da RU (tabela 2).

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS DOS TEMPOS DE DOENÇA NA ÚLTIMA BIÓPSIA

TEMPO DE ACOMPANHAMENTO (anos)	SEM DISPLASIA		COM DISPLASIA	
	Frequência	Percentual	Frequência	Percentual
Menos de 5	50	44,64	4	33,33
De 5 a 9,9	35	31,25	5	41,67
De 10 a 14,9	16	14,29	3	25,00
De 15 a 19,9	7	6,25	-	-
20 ou mais	4	3,57	-	-
TOTAL	112	100,00	12	100,00

FONTE: O autor

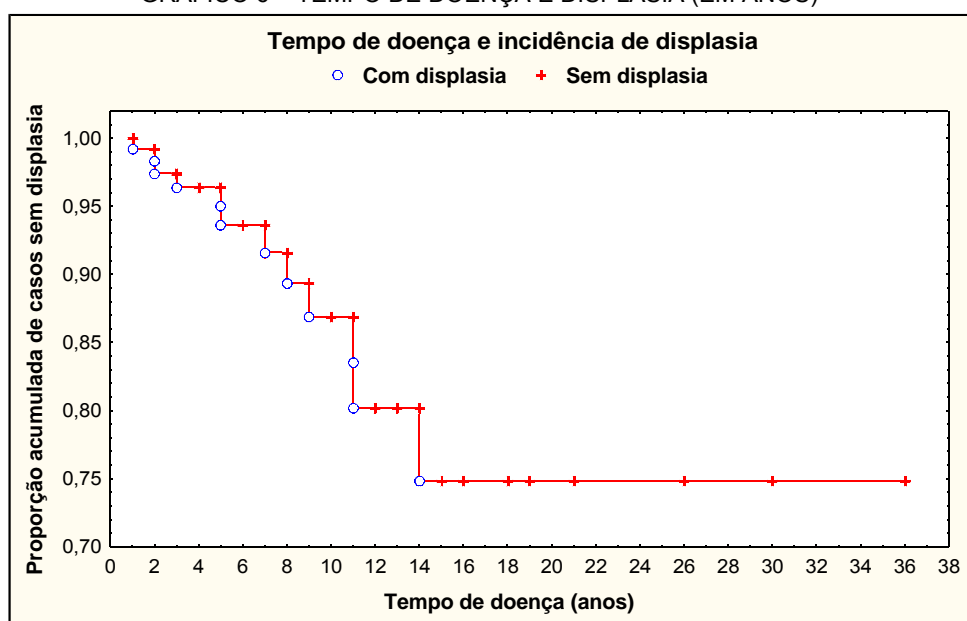
No grupo sem displasia a média do tempo de evolução da RU foi de $6,85 \pm 6,14$ anos e no grupo com displasia foi de $6,50 \pm 4,19$ anos. Testou-se a hipótese nula de que os tempos da RU são iguais nos dois grupos do estudo *versus* a hipótese alternativa de tempo de doença diferente. O resultado do teste estatístico indicou a não-rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ($p=0,8055$) (tabela 3). A incidência dos casos de displasia ao longo do período de acompanhamento da RU é ilustrada no gráfico 6.

TABELA 3. TEMPO DE EVOLUÇÃO

VARIÁVEL	SEM DISPLASIA (n=112)		COM DISPLASIA (n=12)		VALOR DE p*
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
Tempo de doença na última bx	6,85	6,14	6,50	4,19	0,8055

(*) Teste não-paramétrico de Mann-Whitney

GRÁFICO 6 – TEMPO DE DOENÇA E DISPLASIA (EM ANOS)



FONTE: O autor

Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 DISCUSSÃO

A retocolite é doença crônica que vem sendo associada com o câncer colorretal desde 1925, quando CROHN e ROSENBERG documentaram um carcinoma retal como complicação da doença. A ocorrência de carcinoma foi observada em trabalhos subseqüentes (GOLDGRABER; KIRSNER, 1964; MOTTET, 1971). Desde então, a atenção médica tem-se voltado para a displasia encontrada nos exames anatomopatológicos, que se tornou o mais significativo fator preditivo de câncer (GUINDI; RIDDELL, 2001). GORFINE et al. (2000) detectaram 13,1% de casos de displasia em 590 pacientes submetidos à proctocolectomia e determinaram que o valor preditivo positivo para câncer cólico em achado pré-operatório de displasia de qualquer grau é de 50%.

Displasia de baixo grau pode ser detectada em 17% dos pacientes durante acompanhamento com biópsia endoscópica (TYTGAT; DHIR; GOPINATH, 1995). Neste estudo detectou-se displasia de baixo grau em 12 pacientes (9,67%). GORFINE et al. (2000) encontraram maior ocorrência de displasia concomitante com portadores de adenocarcinoma. Na presente amostra 2 pacientes que tinham adenocarcinoma também apresentavam displasia de baixo grau. O diagnóstico de displasia de baixo grau precede o aparecimento da displasia de alto grau ou adenocarcinoma (ULLMAN et al., 2002).

EKBOM et al. (1990) encontraram ocorrência cinco vezes maior de câncer em pacientes com pancolite do que em pacientes com colite do lado esquerdo do cólon. Num estudo de ULLMAN et al. (2002), entre 18 pacientes com DBG, 17 apresentavam pancolite (94%). No presente estudo, dos 12 pacientes com displasia, 7 (58,30%) apresentavam pancolite e 5 (41,70%) colite à esquerda. A extensão da doença não influenciou a ocorrência da displasia ($p=0,1551$). RIEGLER et al. (2003), de forma análoga, não encontraram diferença estatística entre pancolite e colite à esquerda para o câncer.

RIEGLER et al. (2003), em estudo multicêntrico de pacientes com RU que apresentavam displasia de alto grau ou carcinoma colorretal, encontraram uma média de 13,9 anos de evolução de doença, com mediana de 12 anos. EKBOM et al. (1990) encontraram um risco absoluto de câncer colorretal em 30% dos pacientes com pancolite com 35 anos de evolução da doença, e em 40% quando o diagnóstico foi feito antes dos 15 anos de idade. Em discordância com esses autores, neste

estudo não houve diferença na ocorrência de displasia quando o diagnóstico foi realizado antes dos 15 anos de idade ($p=0,8882$).

O tempo de evolução da doença é citado como fator de risco para câncer e displasia colorretal em RU (EKBOM et al., 1990; LENNARD-JONES; MELVILLE; MORSON, 1990; BERNSTEIN et al., 1994; HOOKMAN; BARKIN, 2002). Na casuística deste estudo não houve concordância com essa observação. A comparação dos grupos com e sem displasia não apresentou diferença em relação ao tempo de evolução da doença ($p=0,8055$). ULLMAN et al. (2002) encontraram 39% dos pacientes com DBG com menos de 8 anos de evolução da RU. Neste trabalho, dos 12 pacientes com displasia, 58,30% tinham menos de 8 anos de evolução da RU.

Nesta amostra houve predomínio de pacientes brancos, o que também foi observado em pesquisa feita nos Estados Unidos da América (LIU; CRAWFORD, 2005). Aqui no grupo com displasia havia 11 pacientes brancos e 1 negro. No entanto, quando analisada a influência da cor e o tempo livre de displasia, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p=0,9467$).

Nos Estados Unidos da América as mulheres são mais afetadas pela RU do que os homens (LIU; CRAWFORD, 2005). Em concordância, aqui se encontrou predominância do sexo feminino entre os pacientes com retocolite ulcerativa (69,35%). Em discordância, o estudo epidemiológico europeu feito por BINDER (2004) encontrou maior incidência de RU em homens nas faixas etárias acima de 35 anos.

Em estudo populacional de 3 117 pacientes com RU não houve diferença no risco relativo de câncer colorretal quanto ao sexo (EKBOM et al., 1990). ULLMAN et al. (2002) estudando pacientes com DBG com RU encontraram maior ocorrência em homens (67%). Em nossa casuística foram encontrados mais homens no grupo com displasia quando comparado com o grupo sem displasia, diferença essa significativa ($p=0,0242$) na avaliação estatística.

Neste trabalho a idade dos pacientes com displasia no momento da última biópsia não se correlacionou significativamente com o tempo livre de displasia ($p=0,7920$). A literatura mostra que não há correlação entre idade do indivíduo e maior incidência de displasia (GORFINE et al., 2000; HOOKMAN; BARKIN, 2002).

O tempo de evolução da RU é considerado fator de risco para desenvolvimento das alterações displásicas e neoplásicas (EKBOM et al., 1990; BINDER,

2004). Neste trabalho, o tempo de evolução da doença entre o grupo com e sem displasia não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,8055$).

Apesar da displasia ser considerada o melhor fator preditor de risco de câncer em pacientes com RU, há divergência entre os patologistas no que se refere à sua graduação. A concordância, quando se classifica entre presença ou ausência da displasia, varia entre 68% e 84% (GUINDI; RIDDELL, 2001). Também na presente pesquisa a concordância do diagnóstico de revisão com o diagnóstico prévio foi de 65%.

A superexpressão da proteína nuclear *p53* tem sido estudada como marcador para displasia (ITZKOWITZ, 2003). Embora a mutação do gene *p53* seja considerada um evento tardio na gênese do câncer cólico esporádico, a mutação apresenta-se como evento precoce no câncer associado com colite (LASHNER et al., 1999; ITZKOWITZ, 2003). Nesta amostra 5 pacientes com DBG foram *p53* positivos (41,67%), concordando com dados da literatura que apontam índices de positividade para DBG de 25% a 50% (ILYAS e TALBOT, 1995; LASHNER et al., 1999; WONG et al., 2000; YOSHIDA et al., 2003).

Lesões indefinidas para displasia apresentam positividade para *p53* entre 3% e 12,5% (BRETNALL et al., 1994; NOFFSINGER et al., 2001). Neste trabalho foram encontrados 2 pacientes com ID, todos *p53* negativos.

A positividade para *p53* em adenocarcinomas aqui encontrada foi concordante com a relatada na literatura. Um caso de adenocarcinoma retal apresentou forte coloração (+++) para *p53*; outro caso de adenocarcinoma na flexura direita do cólon foi *p53* negativo. A positividade para os adenocarcinomas em pacientes com RU varia de 50% a 83% (BRETNALL et al., 1994; NOFFSINGER et al., 2001; LASHNER et al., 2003).

Os 2 pacientes com DALM neste trabalho apresentaram forte coloração (++) para *p53*. A presença de lesão tipo DALM correlaciona-se em 43% dos casos com o achado concomitante de adenocarcinoma (BERNSTEIN et al., 1994). Forte expressão (29% dos casos são positivos) da *p53* é encontrada em DALM, mas não em adenoma (ODZE, 1999).

6 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados mostram o seguinte:

1. A ocorrência de displasia foi baixa;
2. A ocorrência de displasia foi maior no sexo masculino;
3. Houve positividade da superexpressão da proteína *p53* na displasia.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M.T. A patogênese da doença inflamatória intestinal: implicações para os clínicos. **Current Gastroenterology Reports – Brasil**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 7-16, abr. 2003.
- AHNEN, D.J. Tissue markers of colon cancer risk. **Gastrointestinal Endoscopy**, Denver, v. 49, n. 3, p. S50-59, 1999.
- ARAI, N.; MITOMI, H.; OHTANI, Y.; IGARASHI, M.; KAKITA, A.; OKAYSU, I. Enhanced epithelial cell turnover associated with *p53* accumulation and high p21 WAF1/CIP1 expression in ulcerative colitis. **Modern Pathology**, Baltimore, v. 12, n. 6, p. 604-611, 1999.
- BAKER, S.J.; PREISINGER, A.C.; JESSUP, J.M.; PARASKEVA, C.; MARKOWITZ, S.; WILLSON, J.K.; HAMILTON, S.; VOGELSTEIN, B. *p53* gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 50, p. 7717-7722, 1990.
- BANCROFT, J.D.; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. New York: Churchill Livingstone, 1977.
- BASS, I.O.; MULDER, J.R.; OFFERHAUS, G.J.A.; VOGELSTEIN, B.; HAMILTON, S.R. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant *p53* gene product in archival colorectal neoplasms. **Journal of Pathology**, Edinburgh, v. 172, p. 5-12, 1994.
- BERNSTEIN, C.N.; SHANAHAN, F.; WEINSATEIN W.M. Are we telling patients the truth about surveillance colonoscopy in ulcerative colitis? **Lancet**, London, v. 343, p. 71-74, 1994.
- BINDER, V. Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, London, v. 18, n. 3, p. 463-479, 2004.
- BLACKSTONE, M.O.; RIDDELL, R.H.; ROGERS, B.H.; LEVIN, B. Dysplasia-associated lesion or mass (DALM) detected by colonoscopy in long-standing ulcerative colitis: an indication for colectomy. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 80, p. 366-374, 1981.
- BRETNALL, T.A.; CRISPIN, D.A.; RABINOVITCH, P.S.; HAGGITT, R.C.; RUBIN, C.E.; STEVENS, A.C.; BURMER, G.C. Mutations in the *p53* gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, Philadelphia v. 107, p. 369-378, 1994.
- BRUEWER, M.; SCHIMID, K.W.; KRIEGLSTEIN, C.F.; SENNINGER, N.; SCHUERMANN, G. Metallothionein: early marker in the carcinogenesis of ulcerative colitis-associated colorectal carcinoma. **World J. Surg.**, New York, v. 26, p. 726-731, 2002.
- CHIODINI, R.J. Crohn's disease and mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. **Clinical Microbiology**, Washington, v. 2, n. 90, 1989.
- COOK, M.G.; GOLIGHER, J.C. Carcinoma and epithelial dysplasia complicating ulcerative colitis. **Gastroenterology**, Philadelphia v. 68, p. 1127-1136, 1975.
- COUNSELL, P.B.; DUKES, C.E. The association of chronic ulcerative colitis and carcinoma of the rectum and colon. **Br. J. Surg.**, Bristol, v. 39, p. 485-489, 1952.

CROHN, B.B.; ROSENBERG, H. The sigmoidoscopic picture of chronic ulcerative colitis (non-specific). **Am. J. Med. Sci.**, New York, v. 170, p. 220-228, 1925.

DEVROEDE, G.J.; TAYLOR, W.F.; SAUER, W.G. Cancer risk and life expectancy of children with ulcerative colitis. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 285, p. 17-21, 1971.

DOBBINS, W.O. III. Current status of the precancer lesion in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, Philadelphia v. 73, p. 1431-1433, 1977.

EKBOM, A.; HELMICK, C.; ZACK, M.; ADAMI, H. Ulcerative colitis and colorectal cancer: a population-based study. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 323, p. 1228-33, 1990.

FENOGLIO, C.M.; PASCAL, R.R. Adenomatous epithelium, intraepithelial anaplasia, and invasive carcinoma in ulcerative colitis. **Am. J. Dig. Dis.**, New York, v. 18, p. 556-562, 1973.

FIELDS, S; JANG, S.K. Presence of a potent transcription activating sequence in the *p53* protein. **Science**, Washington, v. 249, n. 4972, p. 1046-1049, 1990.

FINLAY, C.A.; HINDS, P.W.; TAN, T.H.; ELIYAHU, D.; OREN, M.; LEVINE, A.J. Activating mutations for transformation by *p53* produce a gene product that forms an hsc70-*p53* complex with an altered half-life. **Mol. Cell Biol.**, Washington, v. 8, p. 531-539, 1988.

FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 115, p. 182-205, 1998.

FREITAS, J.A.; TACLA, M. Retocolite ulcerativa. In: DANI, R. 2. ed. **Gastroenterologia essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 362-373.

FUSON, J.A.; FARMER, R.G.; HAWK, W.A.; SULLIVAN, B.H. Endoscopic surveillance for cancer in chronic ulcerative colitis. **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v. 73, p. 120-126, 1980.

GALLEGO, M.G.; ACEÑERO, M.J.F.; ORTEGA, J.S.; DELGADO, A.A.; CANTERO, J.L.B. Prognostic influence of *p53* nuclear overexpression in colorectal carcinoma. **Dis. Colon Rectum**, Philadelphia v. 43, n. 7, p. 971-975, 2000.

GEWERTZ, B.L.; DENT, T.L.; APPELMAN, H.D. Implications of precancerous rectal biopsy in patients with inflammatory bowel disease. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 111, p. 326-329, 1976.

GLICKMAN, R.M. Inflammatory bowel disease: ulcerative colitis and Crohn's disease. In: HARRISON, T.R. 14.ed. **Harrison's principles of internal medicine**. New York: McGraw-Hill, 1998. 1 CD ROM.

GOLDGRABER, M.B.; KIRSNER, J.B. Carcinoma of the colon in ulcerative colitis. **Cancer**, West Orange, v. 17, p. 657-663, 1964.

GORFINE, S.R.; BAUER, J.J.; HARRIS, M.T.; KREEL, I. Displasia complicating chronic ulcerative colitis: is immediate colectomy warranted? **Dis. Colon Rectum**, Philadelphia v. 43, n. 11, p. 1575-1581, 2000.

GOTTLIEB, T.M.; OREN, M. *p53* in growth control and neoplasia. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 128, p. 77-102, 1996.

GREENBLATT, M.S.; BENNETT, W.P.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C.C. Mutations in the *p53* tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 54, p. 4855-4878, 1994.

GUINDI, M; RIDDELL, R.H. The pathology of epithelial pre-malignancy of the gastrointestinal tract. **Best Pract. & Res. Clin. Gastroenterology**, London, v. 15, p. 191-210, 2001.

HAMELIN, R.; LAURENT-PUIG, P.; OLSCHWANG, S.; JEGO, N.; ASSELAIN, B.; REMVIKOS, Y.; GIRODET, J.; SALMON, R.J.; THOMAS, G. Association of *p53* mutations with short survival in colorectal cancer. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 106, p. 42-48, 1994.

HAMELIN, R.; LAURENT-PUIG, P. *p53* and colorectal cancer. **Pathol. Biol.**, Paris, v. 45, n. 10, p. 876-881, 1997.

HOLZMANN, K.; WEIS-KLEMM, M.; KLUMP, B.; HSIEH, J.; BORCHARD, F.; GREGOR, M.; PORSCHE, R. Comparison of flow cytometry and histology with mutational screening for *p53* and Ki-ras mutations in surveillance of patients with long-standing ulcerative colitis. **Scand. J. Gastroenterol.**, Oslo, v. 12, p. 1320-1326, 2001.

HOOKMAN, P.; BARKIN, J.S. What should be the standard of care for cancer surveillance, diagnosis of dysplasia, and the decision for colectomy in chronic inflammatory bowel disease? **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v. 97, n. 5, p. 1249-1255, 2002.

HULTEN, L.; KEWENTER, J.; AHREN, C. Precancer and carcinoma in chronic ulcerative colitis: a histopathological and clinical investigation. **Scand. J. Gastroenterol.**, Oslo, v. 7, p. 663-669, 1972.

ILYAS, M.; TALBOT, I.C. *P53* Expression in ulcerative colitis: a longitudinal study. **Gut**, London v. 36, n. 6, p. 802-804, 1995.

ISHITSUKA, T.; KASHIWAGI, H.; KONISHI, F. Microsatellite instability in inflamed and neoplastic epithelium in ulcerative colitis. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 54, p. 526-532, 2001.

ITZKOWITZ, S. Colon carcinogenesis in inflammatory bowel disease: applying molecular genetics to clinical practice. **Journal of Clinical Gastroenterology**, New York, v. 38, n. 5, p. 70-74, 2003.

KANDICE, L.K. Inflammatory bowel disease. **Clinical Cornerstone**, Belle Mead, v. 4 n. 4, p. 49-57, 2002.

KEWENTER, J.; AHLMAN, H.; HULTEN, L. Cancer risk in extensive ulcerative colitis. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 188, p. 824-828, 1978.

KO, L.J.; PRIVES, C. *p53*: puzzle and paradigm. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor NY, v. 10, p. 1054-1072, 1996.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S.L.; COTRAN, V. Neoplasia. In: _____. **Robbins e Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 287.

LANE, D.P. Câncer. *P53*, guardian of the genome. **Nature**, London, v. 358, p. 15-16, 1992.

LANE, D.P.; CRAWFORD, L.V. T antigen is bound to a host protein in SV40- transformed cells. **Nature**, London, v. 278, p. 261-263, 1979.

LASHNER, B.A.; BAUER, W.M.; RYBICKI, L.A.; GOLDBLUM, J.R. Abnormal *p53* immunohistochemistry is associated with an increased colorectal cancer-related mortality in patients with ulcerative colitis. **Am. J.Gastroenterol.**, New York, v. 98, n. 6, p. 1423-1427, 2003.

LASHNER, B.A.; SHAPIRO, B.D.; HUSAIN, A.; GOLDBLUM, J.R. Evaluation of the usefulness of testing for *p53* mutations in colorectal cancer surveillance for ulcerative colitis. **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v. 94, n. 2, p. 456-462, 1999.

LENNARD-JONES, J.E.; MELVILLE, D.M.; MORSON B. Precancer and cancer in extensive ulcerative colitis: findings among 401 patients over 22 years. **Gut**, London, v. 31, p. 800-806, 1990.

LENNARD-JONES, J.E.; MORSON, B.C.; RITCHIE, J.K. Cancer in colitis: assessment of the individual risk by clinical and histological criteria. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 73, p. 1280-1289, 1977.

LEVINE, A.J.; WU, M.C.; CHANG, A.; SILVER, A.; ATTIYEH, E.F.; LIN, J.; EPSTEIN, C.B. The spectrum of mutations at the *p53* locus: evidence for tissue-specific mutagenesis, selection of mutant alleles, and a "gain of function" phenotype. **Ann. NY Acad. Sci.**, New York, v. 768, p. 111-128, 1995.

LEVINE, D.S.; HAGGITT, R.C. Normal histology of the colon. **The American Journal of Surgical Pathology**, New York, v. 13, p. 966-984, 1989.

LIU, C.; CRAWFORD, J.M. O trato gastrointestinal. In: ROBBINS, S.L.; COTRAN, V.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, Nn 7. ed. **Robbins e Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 869-893.

MACDERMOTT, R.P.; STENSON, W.F. Alterations of the immune system in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Advances in Immunology**, New York, v. 42, p. 285, 1988.

MATTOS, M.C.F.I. Transtornos do crescimento e da diferenciação celulares. In: MONTENEGRO, M.F.; FRANCO, M. **Patologia: processos gerais**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 209-222.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico**. São Paulo: Editora Pedagógica Universitária, 1980.

MIYASHITA, T.; REED, J.C. Tumor suppressor *p53* is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. **Cell**, Cambridge, v. 80, p. 293-299, 1995.

MORSON, B.C.; PANG, L.S.C. Rectal biopsy as an aid to cancer control in ulcerative colitis. **Gut**, London, v. 8, p. 423-428, 1967.

MORSON, B.C.; DAWSON, I.M.P.; DAY, D.W.; JASS, J.R.; PRICE, A.B.; WILLIAMS, G.T. Section VI / Large intestine. In: _____. **Morson & Dawson's gastrointestinal pathology**. 3. ed. London: Blackwell, 1990. p. 477-549.

MOTTET, N.K. **Histopathologic spectrum of regional enteritis and ulcerative colitis.** Philadelphia: WB Saunders, 1971.

MYRVOLD, H.E.; KOCK, N.G.; AHREN, C. Rectal biopsy and precancer in ulcerative colitis. **Gut**, London, v. 15, p. 301-304, 1974.

NIGRO, J.M.; BAKER, S.J.; PREISINGER, A.C.; JESSUP J.M.; HOSTETTER, R.; CLEARY, K.; BIGNER, S.H.; DAVIDSON, N.; BAYLIN, S.; DEVILEE, P. Mutations in the *p53* gene occur in diverse human tumour types. **Nature**, London, v. 342, p. 705-708, 1989.

NOFFSINGER, A.E.; BELLI, J.M.; MILLER, M.A.; FENOGLIO-PREISER, C.M. A unique basal pattern of *p53* expression in ulcerative colitis is associated with mutation in the *p53* gene. **Histopathology**, Oxford, v. 39, p. 482-492, 2001.

NUGENT, F.W.; HAGGITT, R.C.; COLCHER, H.; KUTTERUF, G.C. Malignant potential of chronic ulcerative colitis: preliminary report. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 76, p. 1-5, 1979.

ODZE, R.D. Adenomas and adenoma-like DALMs in chronic ulcerative colitis: a clinical, pathological, and molecular review. **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v. 94, n. 7, p. 1746-1750, 1999.

OLTVAI, Z.N.; MILLIMAN, C.L.; KORSMEYERQ, S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**, Cambridge, v. 74, p. 609-619, 1993.

PASCAL, R.R. Dysplasia and early carcinoma in inflammatory bowel disease and colorectal adenomas. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 25, n. 11, p. 1160-1171, 1994.

PETRAS, R.E. Doenças intestinais não neoplásicas. In: MILLS, S.E.; CARTER, D.; GREENSON, J.K.; OBERMAN, H.A.; REUTER, V.; STOLER, M.H. **Sternberg's diagnostic surgical pathology**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 1506-1508.

PIGNATELLI, M.; STAMP, G.W.; KAFIRI, G.; LANE, D.; BODMER, W.F. Over-expression of *p53* nuclear oncoprotein in colorectal adenomas. **Int. J. Cancer**, New York, v. 50, p. 683-688, 1992.

POHL, C.; HOMBACH, A.; KRUIS, W. Chronic inflammatory bowel disease and cancer. **Hepato Gastroenterology**, Stuttgart, v. 47, n. 31, p. 57-70, 2000.

RAWET, V. Estado atual da investigação dos marcadores prognósticos no câncer do intestino grosso. **NewsLab**, São Paulo, v. 1, p. 43-47, 1993.

RIBEIRO JR., U.; ALVES, V.A.; SOUZA, P.M.S.B.; SAFATLE-RIBEIRO, A.V.; RAWET, V.; NONOGAKI, S.; GAMA RODRIGUES, J.; HABR GAMA, A. *p53* overexpression predicts outcome following multimodality therapy in low rectal cancer. **Dis. Colon Rectum**, Philadelphia, v. 43, p. A47, 2000.

RIDDELL, R.H. Pré-malignant and early malignant lesions of the gastrointestinal tract: definitions, terminology and problems. **American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 91, p. 864-872, 1996.

RIDDELL, R.H. The precarcinomatous phase of ulcerative colitis. **Curr. Topics Pathol.**, Berlin, v. 63, p. 179-219, 1976.

RIDDELL, R.H.; GOLDMAN, H.; RANSOHOFF, D.F.; APPELMAN, H.D.; FENOGLIO, C.M.; HAGGITT, R.C.; AHREN, C.; CORREA, P.; HAMILTON, S.R.; MORSON, B.C.; SOMMERS, S.C.; YARDLEY, J.H. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 14, n. 11, p. 931-968, 1983.

RIEGLER, G.; BOSSA, F.; CASERTA, L.; PERA, A.; TONELLI, F.; STURNIOLO, G.C.; OLIVA, L.; CONTESSINI, A.E.; POGGIOLI, G. Colorectal cancer and high grade dysplasia complicating ulcerative colitis in Italy: a retrospective co-operative IG-IBD study. **Dig. Liver Dis.**, Roma, v. 35, p. 628-634, 2003.

ROSE, S. Inflammatory bowel disease. In: _____ (Ed). **Gastrointestinal and hepatobiliary pathophysiology**. Madison Conn: Fence Creek Publishing, 1998. p. 245-257.

RUBIN, C.E.; HAGGITT, R.C.; BURMER, G.C.; BRETNALL, T.A.; STEVENS, A.C.; LEVINE, D.S.; DEAN, P.J.; KIMMEY, M.; PERERA, D.R.; RABINOVITCH, P.S. DNA aneuploidy in colonic biopsies predicts future development of dysplasia in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 103, p. 1611-20, 1992.

SARTOR, R.B. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 92, Suppl 12, p. 5S-11S, 1997.

SHIRASAWA, S.; URABE, K.; YANAGAWA, Y.; TOSHITANI, K.; IWAMA, T.; SASAZUKI, T. p53 gene mutations in colorectal tumors from patients with familial polyposis coli. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 51, p. 2874-2878, 1991.

SILVESTRINI, R.; BENINI, E.; DAIDONE, M.G.; VENERONI, S.; BORACCHI, P.; CAPPELLETTI, V.; DI FRONZO, G.; VERONESI, U. p53 as an independent prognostic marker in lymphnode-negative breast cancer patients. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v.85, p. 965-970, 1993.

SPENCER, M. **Fundamentals of light microscopy**. Cambridge: University Press, 1982.

STENSON, W. Inflammatory bowel disease. In: YAMADA et al. (Ed.). **Textbook of gastroenterology**. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1995. v. 1, p. 1754-1757.

TALBOT, I.C.; PRICE A. B. **Biopsy pathology in colorectal disease**. London: Chapman and Hall, 1987, p. 117-145.

TANAKA, M.; RIDDELL, R.H.; SAITO, H.; SOMA, Y.; HIDAKA, H.; KUDO, H. Morphologic criteria applicable to biopsy specimens for effective distinction of inflammatory bowel disease from others forms of colitis and of Crohn's disease from ulcerative colitis. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 34, p. 55-67, 1999.

TSIANOS, E.V. Risk of cancer in inflammatory bowel disease (IBD). **European Journal of Internal Medicine**, Amsterdam, v. 11, p. 75-78, 2000.

TYTGAT, G.N.J.; DHIR, V.; GOPINATH, N. Endoscopic appearance of dysplasia and câncer in inflammatory bowel disease. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 31A, n. 7/8, p. 1174-1177, 1995.

ULLMAN, T.A.; LOFTUS JR., E.V.; KAKAR, S.; BURGART, L.J.; SANDBORN, W.J.; TREMAINE, W.J. The fate of low grade dysplasia in ulcerative colitis. **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v. 97, n. 4, p. 921-927, 2002.

URBANSKI, S.J.; FOGT, F. Dysplasia in chronic ulcerative colitis: a molecular approach to its differential diagnosis. **Int. J. Surg. Pathology**, Glen Head, v. 8, n. 1, p. 11-16, 2000.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A. J. Surfing the *p53* network. **Nature**, London, v. 408, p. 307-310, 2000.

WALDMAN, T; KINZLER K.W.; VOLGESTEIN, B. *p21* is necessary for the *p-53* mediated G1 arrest in human cancer cells. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 55, p. 5187-5190, 1995.

WARREN, S.; SOMMERS, S.C. Pathogenesis of ulcerative colitis. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 25, p. 657-661, 1949.

WONG, N.A.C.S.; MAYER, N.J.; MACKELL, S.; GILMOUR, H.M.; HARRISON, D.J. Immunohistochemical assessment of Ki67 and *p53* expression assist the diagnosis and grading of ulcerative colitis-related dysplasia. **Histopathology**, Oxford, v. 37, p. 108-114, 2000.

YAMAGUCHI, N.H.; ALVES, V.A.; HABR-GAMA, A.; WAKAMATSU, A.; NAKAJIMA, G.; NADALIN, W.; GOMES, I.I.; DUARTE, A.J.; BEVILACQUA, R.G. *p53* immunocytochemical analysis in anal neoplasms (Meeting abstract). **Proc. Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol.**, Baltimore, v. 14, p. A1806, 1995.

YARDLEY, J.H.; KEREN, D.F. "Precancer" lesions in ulcerative colitis: a retrospective study of rectal biopsy and colectomy specimens. **Cancer**, West Orange, v. 34, p. 835-844, 1974.

YIN, J.; HARPAZ, N.; TONG, Y.; HUANG, Y.; LAURIN, J.; GREENWALD, B.D.; HONTANOSAS, M.; NEWKIRK, C.; MELTZER, S.J. *P53* point mutations in dysplastic and cancerous ulcerative colitis lesions. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 104, p. 1633-1639, 1993.

YOSHIDA, T.; MIKAMI, T.; MITOMI, H.; OKAYASU, I. Diverse *p53* alterations in ulcerative colitis-associated low-grade dysplasia: full-length gene sequencing in microdissected single crypts. **Journal of Pathology**, Edinburgh, v. 199, p. 166-175, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - CRITÉRIOS HISTOPATOLÓGICOS PARA DIFERENCIAÇÃO ENTRE DISPLASIA E REPARO

VARIÁVEL HISTOLÓGICA	DISPLASIA	(caso)	REPARO	CATEGORIA DIAGNÓSTICA	OBS.
Aumento nuclear	+ / +++		+		
Hipercromasia nuclear	++		+		
Pleomorfismo nuclear	+ / +++		0 / +		
Contornos nucleares irregulares	+ / +++		0 / +		
Cromocentros e/ou nucleolos	0 / +		++ / +++		
Estratificação nuclear	0 / +++		+		
Perda da polaridade nuclear	0 / ++		0		
Mitoses aumentadas	+ / +++		++		
<i>Milieu</i> inflamatório	+ / ++		++		
Depleção de mucina intracitoplásmica	0 / +++		++		
Relação N/C alta	++ / +++		0 / +		
Eosinofilia citoplasmática	0		+		
Distorção da arquitetura mucosa	0 / +++		+ / ++		
Configuração vilosa	0 / +++		0		

FONTE: PETRAS, R.E. **Sternberg's diagnostic surgical pathology**. 4. ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 1505.

0=NENHUM; + = DISCRETO; ++ = MODERADO; +++= SEVERO.

APÊNDICE 2 - EXAMES COM DISPLASIA E RESULTADOS DA P53

PACIENTE	LÂMINA	Extensão	DIAGNÓSTICO PRÉVIO	DIAGNÓSTICO NA REVISÃO	P53 (%)	P53+
CSG	03-7915	Cólon esquerdo	DBG	DBG	24	Positivo+
DJC	97-5436	Pancolite	ID	DBG	39	Positivo++
JBS	00-6203	Cólon esquerdo	ID	DBG	52	Positivo+++
JRC	04-2297	Cólon esquerdo	DALM	DALM	93	Positivo +++
JRC	04-3954	Cólon esquerdo	TUMOR	Tumor	77 - 92	Positivo+++
JS	99-7727-6	Pancolite	DALM	DALM	68	Positivo+++
AAM	03-7195-6	Pancolite	DBG	DBG	8	Negativo
AAM	03-7195-5	Pancolite	DBG	ID	6	Negativo
AAM	03-7195-3	Pancolite	DBG	ID	9	Negativo
AMM	03-6689	Pancolite	ID	DBG	4	Negativo
FAB	03-9124	Cólon esquerdo	DBG	DBG	6	Negativo
JBS	04-4431	Cólon esquerdo	DBG	DBG	2	Negativo
JS	99-7727-5	Pancolite	DBG	ID	3	Negativo
MB	02-8175	Cólon esquerdo	ID	DBG	5	Negativo
MG	98-5787	Pancolite	DBG	DBG	1	Negativo
MIC	99-4010-3	Pancolite	DBG	DBG	4	Negativo
MIC	99-4010-6	Pancolite	DBG	DBG	2	Negativo
MIC	99-6057-T	Pancolite	Tumor	Tumor	3	Negativo
MIC	99-6057-3	Pancolite	DBG	DBG	2	Negativo
SN	98-4720-2	Pancolite	DBG	DBG	4	Negativo
SN	98-4720-3	Pancolite	DBG	DBG	4	Negativo
SN	98-4720-4	Pancolite	DBG	DBG	3	Negativo

FONTE: O autor

EXT: extensão da RC; DIAG: diagnóstico; ID: indefinido para displasia; DBG: displasia de baixo Grau; DALM: displasia associada a lesão ou massa; Tumor: adenocarcinoma.